



PROGRAMA IBEROAMERICANO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA PARA EL DESARROLLO



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



LIBRO DE RESÚMENES

ACTUALIZACIÓN EN VIROSIS CON POTENCIAL EPIDÉMICO DE IMPORTANCIA REGIONAL II REUNIÓN ANUAL DE COVIRED-CYTED



Del **27** al **30** de
Noviembre 2023



Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
"Dr. Manuel Martínez Báez"

Goñi, Sandra

**Actualización en virosis con potencial epidémico de importancia regional
y II Reunión Anual de COVIRed-CYTED / Sandra Goñi ; Mercedes Pastrini. - 1a ed.
- Bernal : Universidad Nacional de Quilmes, 2024.**

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga

ISBN 978-987-558-949-0

**1. Virus. 2. Salud Pública. I. Pastrini, Mercedes II. Título
CDD 362.19691**

ISBN 978-987-558-949-0



9 7 8 9 8 7 5 5 8 9 4 9 0

ÍNDICE

Actualización en Virosis con Potencial Epidémico de Importancia Regional.....	5
Sandra Goñi	
Programa Diario de Ponencias e Intercambios.....	7
COVIRed, una acción estratégica de CYTED.....	12
Sandra Goñi	
El InDRE como referencia nacional e internacional.....	16
Lucía Hernández Rivas	
SESIÓN ARBOVIRUS EMERGENTES Y NEUROTROPICOS.....	22
Sandra Goñi y Leticia Franco	
Virus neurotrópicos en España y Europa (WNV y USUV).....	24
Ana Vázquez	
Mayaro y Oropouche: un riesgo latente.....	27
Felipe Naveca	
Arbovirus neurotrópicos en las Américas: importancia del diagnóstico diferencial.....	31
María Alejandra Morales y Victoria Luppó	
SESIÓN ARBOVIRUS ENDÉMICOS.....	34
Vanessa López y Wendy Murillo	
Desafíos en el diagnóstico y vigilancia de dengue ante la emergencia de otros arbovirosis en la Región de las Américas.....	36
Lionel Gresh	
Panorama epidemiológico y sistema de vigilancia de las arbovirosis en México.....	41
Santa Elizabeth Ceballos Liceaga	
Respuesta de la Vigilancia por laboratorio ante el brote de Chikungunya en Paraguay.....	48
Shirley Desiree Villalba	
Detección de virus en mosquitos: implementación de la vigilancia entomoviológica (RELEVA).....	51
Leticia Franco	

SESIÓN VIRUS RESPIRATORIOS I y II.....	52
Ángel Gustavo Guevara, Yamilka Díaz y Modesto Cruz	
Vigilancia virológica de virus respiratorios en el contexto de la OMS.....	54
Juliana Leite y Paula Couto	
Atención a emergencias para Virus Sincicial Respiratorio.....	59
Abel Peralta Benítez	
Vigilancia de Influenza aviar en humanos.....	64
Rosaura Idania Gutierrez Vargas y Gisela Barrera Badillo	
Experiência de Portugal na vigilância dos vírus respiratórios durante a pandemia e a adaptação do sistema de vigilância para este inverno 2023-2024.....	67
Raquel Giomar	
Actualidad y métodos de diagnóstico de las virosis respiratorias.....	71
Inmaculada Casas	
Vigilancia Genómica de virus respiratorios en ambiente construido y aguas residuales.....	76
Fernando Valiente	
Experiencia del CoViGen-Mex en la vigilancia genómica de SARS-CoV-2.....	81
Blanca Taboada	
SESIÓN VIROLOGÍA E INMUNOLOGÍA BÁSICAS I.....	87
Carlos Ortega y Paola Waleska Aguirre	
Nuevos métodos de diagnóstico molecular para enfermedades endémicas y emergentes.....	90
Jesse Waggoner	
Uso potencial de secuencias peptídicas como agentes antivirales (Red Temática CYTED).....	96
Carlos Muñoz-Garay	
Detección, caracterización y primera identificación de reordenamiento genético del virus Toscana por secuenciación metagenómica no dirigida en pacientes con meningitis idiopática, Andalucía, España, 2015-2019.....	100
María Dolores Fernández García	
Búsqueda e identificación de péptidos antigénicos para el	

diagnóstico diferencial entre Dengue y Zika.....	105
Yolanda Medina Flores	
Estrategias biotecnológicas para la generación de herramientas	
diagnósticas y terapéuticas.....	108
Sandra Goñi y Mercedes Pastorini	
Los murciélagos como hospedadores virales. Un enfoque ecosistémico.....	113
Adriana Delfraro	
Situación actual y perspectivas de hantavirus en México.....	118
Ana Laura Viguera Galván	
Presentación clínica por serotipo de dengue en un estudio	
pediátrico en Managua, 2004-2021.....	122
Ángel Balmaseda	
SESIÓN VIGILANCIA GENÓMICA.....	123
Flor Pujol y Susana Revollo	
Estrategia y Redes de Vigilancia Genómica de la OPS (PAHOGen).....	125
Leticia Franco	
Implementación de la vigilancia genómica de influenza	
en México por el CoViGen-Mex.....	127
Selene Zárate	
Detección del genotipo Cosmopolitan DENV-2.....	132
Paquita García Mendoza	
Desarrollo de una plataforma para la detección y caracterización de virus	
transmitidos por Aedes aegypti mediante NGS.....	134
Lucas Ripoll	
Vigilancia genómica del SARS-CoV-2 en Centroamérica.....	140
Alexander Martínez	
SESIÓN VIROLOGÍA E INMUNOLOGÍA BÁSICAS II.....	143
Rodrigo Aparicio Antonio y Sharon Porras	
Caracterización molecular de patógenos de	
importancia en salud pública.....	145
José Ernesto Ramírez González	
Estudio de los genotipos del virus del papiloma humano (VPH) prevalentes en lesiones	
cervicales en la población Mexicana.....	150

Noé Escobar Escamilla

Visita a laboratorios del Departamento de Biología Molecular y Validación de Técnicas.

COVID-19, retos y experiencias.....155

Eréndira Molina Gómez

Identificación de SARS-Cov-2 por Multiplex RT-PCR y Electroforesis Capilar.....161

Susana Revollo

ACTUALIZACIÓN EN VIROSIS CON POTENCIAL EPIDÉMICO DE IMPORTANCIA REGIONAL

SANDRA GOÑI / sandra.goni@unq.edu.ar

Laboratorio de Virus Emergentes, Instituto de Microbiología Básica y Aplicada, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Argentina.

Coordinadora COVIRed (2023-2024)

Este libro de resúmenes reúne los trabajos presentados en la segunda actividad presencial de COVIRed, acción estratégica del Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED), realizada en articulación con la Organización Panamericana de la Salud (OPS). La misma fue realizada entre los días 27 a 30 de noviembre de 2023, en la Dirección General de Epidemiología (DGE), Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) “Dr. Manuel Martínez Báez” de la ciudad de México.

La agenda de las jornadas de **Actualización en Virosis con Potencial Epidémico de Importancia Regional**, fueron organizadas en diferentes sesiones de manera tal que todas las temáticas fuesen abordadas.

En primer término, la sesión de Arbovirus Emergentes y Neurotrópicos se desarrolló bajo la coordinación de la Dra. Leticia Franco (OPS) y la Dra. Sandra Goñi (Argentina). Más tarde en la misma jornada, tuvo lugar la sesión de Arbovirus Endémicos, con la coordinación de la Dra. Vanessa López (México) y la Dra. Wendy Murillo (Honduras). Al día siguiente, tuvimos las ponencias de las sesiones de Virus Respiratorios I y II. El Dr. Ángel Gustavo Guevara (Ecuador) y la Lic. Yamilka Díaz (Panamá) coordinaron la primera sesión, mientras que la segunda parte estuvo coordinada por el Dr. Modesto Cruz (República Dominicana). Durante la tercera jornada, durante la mañana se desarrolló la sesión Virología e Inmunología Básicas I, cuya coordinación estuvo a cargo del Dr. Carlos Ortega (El Salvador) y la Lic. Paola Waleska Aguirre (Guatemala). En la tarde se desarrolló la sesión titulada Vigilancia Genómica, la cual contó con la coordinación de las Dras. Flor Pujol (Venezuela) y Susana Revollo (Bolivia). En la última jornada, se llevó adelante la sesión Virología e Inmunología Básicas II, coordinada por el M. en C. Rodrigo Aparicio Antonio (México) y la Lic. Sharon Porras (Costa Rica).

Desde COVIRed, agradecemos a la Dirección General de Epidemiología (DGE), Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) “Dr. Manuel Martínez Báez” de la ciudad de México por recibirnos en su Institución y garantizar el desarrollo de las actividades de intercambio. Específicamente, queremos destacar la excelente predisposición del equipo, representado por la Biól. Irma López Martínez (Directora de Diagnóstico y Referencia), M. en C. Rodrigo Aparicio Antonio (Coordinación de Estudios de Laboratorio en apoyo a la Salud Pública), D. en C. Herlinda García Lozano (Encargada del Despacho de los asuntos correspondientes al Departamento de Virología), M. en G.S. Lucía Hernández Rivas (Directora de Servicios y Apoyo Técnico), M. en C. Eréndira Molina Gómez (Jefa del departamento de Biología Molecular y Validación de Técnicas) y Dr. José Ernesto Ramírez González (Departamento de Biología Molecular).

Asimismo, extender el agradecimiento al personal de OPS con quienes coordinamos las diferentes sesiones propuestas para el encuentro, especialmente a la Dra. Leticia Franco, oficial técnico de diagnóstico virológico del Equipo de respuesta de laboratorio, Programa de Emergencia en Salud, al Dr. Lionel Gresh, equipo de virología y laboratorio, Oficina Regional, Unidad Gestión de Amenazas Infecciosas, al Dr. Jairo Mendez-Rico, Asesor Regional de Enfermedades Virales, OPS, Oficina Regional, Unidad Gestión de Amenazas Infecciosas, y al Dr. Jean-Marc Gabastou, asesor internacional OPS México.

Las y las invitamos a recorrer los diferentes trabajos presentados, trazando una conexión entre los abordajes virológicos llevados adelante en Iberoamérica.



Foto 1. Fotografía grupal en el espacio central del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) “Dr. Manuel Martínez Báez” de la ciudad de México. Fotografía tomada por personal de prensa del InDRE.

PROGRAMA DIARIO DE PONENCIAS E INTERCAMBIOS

PRIMER DÍA: 27 de noviembre del 2023		
Sede: Auditorio del InDRE		
Hora	Tópico	Responsable
8:30-9:00	Registro de los participantes	
9:00-9:30	Ceremonia Inaugural: Autoridades Dirección General de Epidemiología (DGE), Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez” (InDRE), Organización Panamericana de la Salud (OPS), COVIRed	Dr. Jean Marc Gabastou Organización Panamericana de la Salud Biól. Irma Lopez Martínez Directora de Diagnóstico y Referencia-InDRE M. en GS. Lucia Hernández Rivas Directora de Servicios y Apoyo Técnico -InDRE Dra. Sandra Goñi Coordinadora COVIRed, Acción Estratégica CYTED, Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo
09:35-10:15	El InDRE como referencia nacional e internacional	Lucía Hernández Rivas (México)
10:15-10:30	COVIRed . Presentación de los participantes y encuadre de la agenda de reunión	Sandra Goñi (Argentina, Coordinadora COVIRed)
Sesión Arbovirus Emergentes / Neurotrópicos Coordinan: Dra. Leticia Franco (OPS) y Sandra Goñi (Argentina)		
10:30-11:00 Virtual	Arbovirus neurotrópicos en España y Europa (WNV, USUV, TBEV y TOSV)	Ana Vázquez (España)
11:00-11:20	CAFÉ	
11:20-11:40 Virtual	Mayaro y Oropouche: un riesgo latente	Felipe Naveca (Brasil)
11:40-12:00	Arbovirus neurotrópicos en las Américas: importancia del diagnóstico diferencial	Victoria Luppo
12:00-13:00	<u>Mesa de discusión</u> Preparación y respuesta a arbovirus emergentes/neurotrópicos	Todos y todas
13:00-13:30	Sesión de integración	Rosalba Pérez (México)
13:30-14:30	ALMUERZO	
Sesión Arbovirus Endémicos Coordinan: Vanessa López (México) y Wendy Murillo (Honduras)		

14:30-14:50 Virtual	Desafíos en el diagnóstico y vigilancia de dengue ante la emergencia de otras arbovirosis en la Región de las Américas	Lionel Gresh (OPS)
14:50-15:10	Panorama Epidemiológico y Sistema de Vigilancia de las arbovirosis en México	Santa Elizabeth Ceballos Liceaga (México)
15:10-15:30	Alertas tempranas y estrategias innovadoras en el control de vectores	Fabián Correa Morales (México)
15:30-15:50	Respuesta de la Vigilancia por laboratorio ante el brote de Chikungunya en Paraguay	Lesly (Paraguay)
15:50-16:10	Detección de virus en mosquitos: implementación de la vigilancia entomoviológica (RELEVA)	Leticia Franco (OPS)
16:10-16:30	<u>Mesa de discusión</u> Actualidad de los arbovirus en la región de las Américas	Todos y todas

SEGUNDO DÍA: 28 de noviembre del 2023		
Sede: Auditorio del InDRE		
Sesión Virus Respiratorios I		
Coordinan: Ángel Gustavo Guevara (Ecuador) y Yamilka Díaz (Panamá)		
Hora	Tópico	Responsable
9:00-9:15 Virtual	Vigilancia de Virus Sincicial Respiratorio en las Américas	Paula Couto (OPS)
9:15-9:45 Virtual	Atención a emergencias para Virus Sincicial Respiratorio	Dr. Abel Peralta Benítez (México)
9:45-10:05 Virtual	Vigilancia virológica de Virus respiratorios en el contexto de la OMS	Juliana Leite (OPS)
10:05-10:30	<u>Mesa de discusión</u> Diagnóstico y clínica de virus respiratorios	Todos y todas
10:30-11:00	CAFÉ	
11:00-11:20	Vigilancia de Influenza aviar en México	Carlos Javier Alcazar Ramiro (México)
11:20-11:40	Vigilancia de Influenza aviar en humanos	Rosaura Idania Gutiérrez Vargas y Gisela Barrera Badillo (México)
11:40-12:00	Experiência de Portugal na vigilância dos vírus respiratórios durante a pandemia e a adaptação do sistema de vigilância para este inverno 2023-2024	Raquel Giomar (Portugal)
12:00-12:20	Actualidad y métodos de diagnóstico de las virosis respiratorias	Inmaculada Casas (España)
12:20-13:00	<u>Mesa de discusión</u> Virosis respiratorias emergentes	Todos y todas

13:00-14:00	ALMUERZO	
Sesión Virus Respiratorios II Coordina: Modesto Cruz (República Dominicana)		
14:00-14:30	Vigilancia Genómica de virus respiratorios en ambiente construido y aguas residuales	Fernando Valiente (Chile)
14:30-15:00	Experiencia del CoViGen-Mex en la vigilancia genómica de SARS-CoV-2	Blanca Taboada (México)
15:00-15:30	<u>Mesa de discusión</u> Abordajes estratégicos para la detección de virosis respiratorias	Todos y todas
15:30-16:30	COVIRed : estrategias de trabajo para el 2024	Reunión Integrantes COVIRed

TERCER DÍA: 29 de noviembre del 2023 Sede: Auditorio del INBRE		
Sesión Virología e Inmunología Básicas I Coordinan: Carlos Ortega (El Salvador) y Paola Waleska Aguirre (Guatemala)		
Hora	Tópico	Responsable
9:00-9:30 Virtual	Nuevos métodos de diagnóstico molecular para enfermedades endémicas y emergentes	Jesse Waggoner (USA)
9:30-10:00 Virtual	Detección, caracterización y primera identificación de reordenamiento genético del virus Toscana por secuenciación metagenómica no dirigida en pacientes con meningitis idiopática, Andalucía, España, 2015-2019	María Dolores Fernández García (España)
10:00-10:30	Uso potencial de secuencias peptídicas como agentes antivirales (Red Temática CYTED https://www.fis.unam.mx/~cgaray/redbude.html)	Carlos Muñoz-Garay (México)
10:30-10:45	<u>Mesa de discusión</u> Innovación en diagnóstico y terapéutica en virología	Todos y todas
10:45-11:00	CAFÉ	
11:00-11:20	Búsqueda e identificación de péptidos antigénicos para el diagnóstico diferencial entre Dengue y Zika	Yolanda Medina Flores (México)
11:20-11:35	Estrategias biotecnológicas para la generación de herramientas diagnósticas y terapéuticas	Sandra Goñi/Mercedes Pastorini (Argentina)
11:35-11:50	Los murciélagos como hospedadores virales. Un enfoque ecosistémico.	Adriana Delfraro (Uruguay)

11:50-12:10 Virtual	Situación actual y perspectivas de hantavirus en México	Ana Laura Vigueras Galván (México)
12:10-12:40	Presentación clínica por serotipo de dengue en un estudio pediátrico en Managua, 2004-2021	Ángel Balmaseda (Nicaragua)
12:40-13:30	<u>Mesa de discusión</u> Enfermedades emergentes y reemergentes en Iberoamérica	Todos y todas
13:30 a 14:00 Dinámica Grupal (Rosalba Pérez Meza-México) y Foto Grupal		
14:00-15:00	ALMUERZO	
Sesión Vigilancia Genómica Coordinan: Flor Pujol (Venezuela) y Susana Revollo (Bolivia)		
15:00-15:15	Estrategia y Redes de Vigilancia Genómica de la OPS (PAHOGen)	Leticia Franco (OPS)
15:15-15:30	Vigilancia genómica de virus de importancia en salud pública	Claudia Wong Arámbula (México)
15:30-15:45	Implementación de la vigilancia genómica de influenza en México por el CoViGen-Mex	Selene Zárate (México)
15:45-16:00	Detección del genotipo Cosmopolitan DENV-2	Paquita García Mendoza (Perú)
16:00-16:15 Virtual	Desarrollo de una plataforma para la detección y caracterización de virus transmitidos por <i>Aedes aegypti</i> mediante NGS	Lucas Ripoll (Argentina)
16:15-16:30 Virtual	Vigilancia genómica del SARS-CoV-2 en Centroamérica	Alexander Martínez (Panamá, OPS)
16:30-17:00	<u>Mesa de discusión</u> Relevancia de la vigilancia genómica en el contexto actual	Todos y todas

CUARTO DÍA: 30 de noviembre del 2023		
Sede: Auditorio “Dr. Alfonso Pruneda García” - Dirección General de Epidemiología		
Sesión Virología e Inmunología Básicas II Coordinan: Rodrigo Aparicio Antonio (México) y Sharon Porras (Costa Rica)		
Hora	Tópico	Responsable
9:00-9:15	Bioseguridad en el laboratorio y buenas prácticas en atención a virus emergentes	Anita Aguirre Barbosa (México)
9:15-9:30	Caracterización molecular de patógenos de importancia en salud pública	José Ernesto Ramírez González (México)

9:30-9:45	Estudio de los genotipos del virus del papiloma humano (VPH) prevalentes en lesiones cervicales en la población mexicana	Noé Escobar Escamilla (México)
9:45-10:00	Implementación de diagnóstico por laboratorio de Mpox	Maribel González Villa (México)
10:00-10:30	<u>Mesa de discusión</u> Perspectivas en abordajes diagnósticos y terapéuticos en el campo de la virología	Todos y todas
10:30-11:00	CAFÉ	
11:00-12:15	Visita al Laboratorios Departamento Biología Molecular - InDRE	Eréndira Molina Gómez (México)
12:15-12:30	Un nuevo enfoque para identificar SARS-CoV-2 basado en Múltiplex RT-PCR y electroforesis capilar	Susana Revollo (Bolivia)
12:30-13:30	Conclusiones / Acuerdos / Cierre	Todos y todas
13:30-14:30	ALMUERZO	



Foto 2. Fotografía de la apertura de la reunión “**Actualización en virosis con potencial epidémico de importancia regional**” en el auditorio del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) “Dr. Manuel Martínez Báez” de la ciudad de México. De izquierda a derecha: Dr. Jean Marc Gabastou, asesor internacional en Emergencias en Salud de la Organización Panamericana de la Salud; Dra. Nilza Aslim Rojas Arroyo, ex-Directora de Investigación Operativa Epidemiológica, InDRE; Biól. Irma Lopez Martínez, Directora de Diagnóstico y Referencia, InDRE; Dra. Sandra Goñi, Coordinadora COVIRed-CYTED; M. en GS. Lucía Hernández Rivas, Directora de Servicios y Apoyo Técnico, InDRE. Fotografía tomada por personal de prensa del InDRE.

COVIRed, UNA ACCIÓN ESTRATÉGICA DE CYTED

SANDRA GOÑI / sandra.goni@unq.edu.ar

Laboratorio de Virus Emergentes, Instituto de Microbiología Básica y Aplicada, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Argentina.

Coordinadora COVIRed (2023-2024)

La constante aparición de brotes epidémicos producidos por virus emergentes y reemergentes en nuestros países evidencia que estas virosis emergentes continúan siendo un problema de Salud Pública en Iberoamérica. Los de mayor impacto son los continuos brotes anuales de dengue que se suceden en el continente americano, la súbita aparición de la gripe A (H1N1) que ha tenido un comportamiento pandémico, y recientemente la emergencia de una nueva enfermedad llamada Covid-19, causada por el coronavirus SARS-CoV-2. Estos ejemplos marcan la importancia del interés científico sobre este tema, poniendo de manifiesto la necesidad de abordar los diferentes tópicos de la problemática de manera coordinada y entre todas las partes interesadas.

Un buen ejemplo de esto es la articulación que hace la Organización Panamericana de la Salud en Latinoamérica, a través de la red de laboratorios de referencia nacionales de cada país, tratando de disponer de protocolos rápidos y efectivos de actuación diagnóstica y epidemiológica para una eficaz detección, seguimiento y control de estas infecciones emergentes. La existencia de Laboratorios de Referencia que llevan a cabo dichas tareas es esencial para implementar dichos mecanismos de control y seguimiento de forma rigurosa y efectiva.

Por otro lado, el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) tiene la fortaleza de poder nuclear a instituciones de los 22 países de Iberoamérica que lo integran, a través de acciones como Redes o Proyectos conjuntos, lo que le ha permitido tener a lo largo de su existencia una amplia experiencia en temas de investigación y desarrollo llevados a cabo de forma conjunta por los países. En lo que respecta a la virología, entre los temas que CYTED ha abordado en el pasado, se debe tener en cuenta la ejecución previa de dos redes sobre virus emergentes como fueron:

- a) **RIVE** (Red Iberoamericana de Virus emergentes): obtenida por convocatoria 2005-2008, donde se abarcaron principalmente las emergencias en aquel momento en Iberoamérica de Hantavirus, algunos Arenavirus y West Nile virus y
- b) **VIRORED**, acción estratégica desarrollada entre los años 2009 y 2019, creada como consecuencia de la emergencia del H1N1 y que ha tomado acciones posteriormente en las emergencias de Dengue, Virus respiratorios, Ébola, Chikungunya, Zika y Saint Louis, entre otros.

Estas redes han nucleado instituciones de salud pública (Centros de Referencia Nacionales) y académicas (principalmente Universidades) de la mayoría de los 22 países de Iberoamérica. Ambas iniciativas, a través del establecimiento de relaciones estables entre las instituciones que las conformaron, han permitido un abordaje académico científico sobre los virus emergentes, haciendo sinergia con otras actividades llevadas a cabo por otros organismos sobre esta temática, como las mencionadas por la OPS-OMS, y han contribuido a aportaciones y recomendaciones para las acciones que llevan a cabo las autoridades de Salud Pública de los diferentes países.

Ante la emergencia sanitaria del COVID-19 de forma muy rápida en febrero de 2020, teniendo en cuenta los antecedentes antes mencionados de CYTED en virus emergentes, se propuso desarrollar una “Acción Estratégica” del Programa sobre esta temática. Esta iniciativa, coordinada por el Dr. Juan Arbiza (Uruguay), constituyó una excelente oportunidad para la puesta en marcha de acciones concretas en el contexto pandémico, teniendo en cuenta a las instituciones que los países propusieron a través de los Organismos Nacionales de Ciencia y Tecnología (ONCYT). Estas instituciones son quienes componen los núcleos de actuación, organización y toma de decisiones, de forma que fuese posible alcanzar los objetivos propuestos y así asegurar el éxito y eficacia de esta acción, garantizando el fortalecimiento de países con menor desarrollo sobre este tema en la región, sumando además la participación conjunta con la Organización Panamericana de la Salud en las reuniones, dando la posibilidad de una sinergia entre la salud pública e instituciones de investigación como universidades.

En el año 2020, teniendo en cuenta la situación de emergencia sanitaria en nuestros países, la COVIRed se propuso comenzar por dos aspectos de urgente tratamiento para que los países pudieran contar con recomendaciones obtenidas de discusiones con bases científicas y de consensos de los participantes para tomar decisiones y acciones:

a) Diagnóstico/aspectos virológicos

b) Aspectos clínicos, tratamiento, prevención

En base a estos dos ejes, nos planteamos **objetivos comunes** como facilitar intercambio de conocimientos científico-técnicos entre países, potenciar la capacidad de respuesta ante esta emergencia, estimular la formación de recursos humanos, establecer relaciones inter-institucionales estables y compartir experiencias y conocimientos.

Luego, cada uno de los ejes se organizó en torno a objetivos específicos. Así el eje de **diagnóstico/aspectos virológicos**, coordinado por la Dra. Paquita Garcia (Perú), se propuso:

- Evaluar experiencias con el diagnóstico molecular.
- Validar metodologías moleculares y serológicas para transferencia y apoyo que tengan en cuenta las variantes de los virus que circulan en nuestra región. Intercambio de protocolos, reactivos y controles si fuera necesario.
- Intercambiar información de secuencias obtenidas para analizar el pool genético de los SARS CoV-2 en la región iberoamericana, caracterizando la variabilidad genética de los mismos, para mantener la adecuación de los diagnósticos y la eficacia de las vacunas que se desarrollen.

En el segundo de los ejes, donde se abordaron cuestiones de **aspectos clínicos, tratamiento y prevención**, bajo la coordinación del Dr. Javier Carbone (España), se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- . Análisis de las barreras existentes para la eficacia de las estrategias de contención y mitigación. ¿Qué se puede mejorar en el corto plazo?
- . Evaluar experiencias de implementación de acciones en el primer nivel de atención (atención primaria) en SARS-CoV-2.
- . Evaluar experiencias de adecuación y flujos de pacientes en la atención hospitalaria de pacientes SARS-CoV-2. Cómo evitar el colapso de las instituciones. Utilización de centros alternativos de hospitalización y confinamiento de enfermos. Flujo entre centros.
- . Intercambiar experiencias sobre el uso de distintas estrategias terapéuticas y promover la realización de estudios clínicos multicéntricos con experiencias locales de manejo de SARS-CoV-2: p.e. Ivermectina.

. Creación de un Registro Iberoamericano sobre aspectos básicos de manejo en SARS-CoV-2. Bases para una estandarización de protocolos.

En ambos ejes se realizaron reuniones virtuales donde se pudo evidenciar que la situación de los participantes para el eje b) era mucho más comprometida por encontrarse la mayoría de ellos en la primera línea de combate con el paciente directamente. Para el eje a), se lograron realizar reuniones todos los viernes durante el primer año, luego con una periodicidad quincenal y pasada la parte crítica se continúa con reuniones mensuales. En dichas reuniones se presentaron experiencias de la mayoría de los países y se discutieron implementaciones de métodos o algoritmos diagnósticos con sus ventajas y desventajas para cada país. También las agendas contemplaban la participación de invitados especiales con gran experiencia en temas de emergencia, en muchas ocasiones lo hizo el Dr. Adolfo García-Sastre que participa como consultor internacional de COVIRed.

En noviembre de 2022, se logró realizar la primera actividad presencial y se organizó un Seminario-Taller en Chile sobre dos temas que fueron detectados como los de mayor prioridad para la mayoría de los países: **Neutralización y Secuenciación**. Se aprovechó esta instancia para realizar una reunión de coordinación a fin de delinear futuras actividades, aprovechando que se encontraban la mayoría de los países representados.

Durante el año 2023, se sostuvieron las reuniones mensuales, y a través de la articulación con la Organización Panamericana de la Salud (OPS), fue posible proponer una agenda que atendió las diferentes problemáticas que fueron emergiendo. En el mes de abril, contamos con la participación del Dr. Guillermo Sequera, Director General de Vigilancia de la Salud del Ministerio de Salud de Paraguay y de la Dra. Cynthia Vázquez, Directora Técnica del Laboratorio Central de Salud Pública, Ministerio de Salud de Paraguay, quienes disertaron y compartieron las experiencias en torno a la **epidemia de Chikungunya**. En julio, el Dr. Adolfo García-Sastre (Escuela de Medicina Icahn Mount Sinai, New York, Estados Unidos), nos compartió la exposición “**Emergencia de influenza aviar en el contexto actual**”, mientras que la Dra. Inmaculada Casas Flecha (Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España) expuso una revisión titulada “**Actualidad y métodos de diagnóstico de las virosis respiratorias**.” Luego abordamos la temática de long.COVID, ya que resulta de gran importancia desde el punto de vista clínico-terapéutico. Para este tema, contamos con el equipo de trabajo del Dr. Ludovic Reveiz, Asesor Regional en Evidencia e Investigación de la OPS. Ya en octubre, retomamos el abordaje de Dengue, para lo cual la Dra. Paquita García nos compartió el análisis de la **circulación de Serotipos de dengue e introducción del Genotipo Cosmopolitan en Perú**, y luego invitamos al Dr. Michael Scott (Department of Biological Sciences, Florida Gulf Coast University), para discutir acerca del desarrollo de vacunas para el Dengue. Continuando con la temática de vacunas, y tratando de retomar las discusiones en torno a las estrategias seguidas con COVID-19, contamos con la disertación de la Dra. Liz Alvarez-Lajonchere Ponce de León (Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba), quien nos trajo la temática de las **lecciones aprendidas durante el desarrollo como producto de la vacuna anti COVID-19 Abdala**. Para cerrar el año, contamos con la presencia en nuestro último encuentro virtual de la Dra. Ana Fernandez-Sesma, Profesora del Departamento de Microbiología y del Departamento de Medicina de la Escuela de Medicina Icahn en Mount Sinai, Estados Unidos, quien nos compartió el tema “**Immune responses to dengue Viruses and vaccines**.”

Además de estas reuniones, y en línea con el objetivo de estimular la formación de recursos humanos, llevamos adelante dos talleres virtuales de **secuenciación y análisis de datos**. El primero estuvo a cargo del profesor Héctor Alejandro Ruiz Moreno, MSc. Biología Computacional, Grupo Genómica de Microorganismos Emergentes, Instituto Nacional de

Salud de Colombia, y se realizó en dos jornadas, con la participación de 89 asistentes. El segundo taller contó con la disertación de representantes de 3 empresas (BioSystems, Zymo Research, Illumina), que abordaron diferentes etapas de la metodología, y donde contamos con la asistencia de 100 personas.

Fue así que consideramos clave reunirnos para poder compartir de forma presencial avances, resultados particulares, estrategias de abordaje para las diferentes virosis, pero también compartir un espacio donde se fortalezca la intersección entre la investigación y la salud pública. Así, el encuentro fue denominado **Actualización en Virosis con Potencial Epidémico de Importancia Regional, y II Reunión Anual de COVIRed - CYTED**, con el propósito de reunir estas miradas situadas, y compartir las necesidades y fortalezas que tenemos en cada uno de nuestros países.

La interdisciplinariedad es una pieza clave en la construcción del conocimiento, y sin dudas se vuelve fundamental cuando nos referimos a la soberanía científica de nuestros países. Por medio de acciones como las impulsadas por CYTED y OPS, continuamos afianzando nuestras redes científicas y de salud pública, apostando a dar respuestas profesionales, comprometidas y eficaces que tengan incidencia en las políticas públicas de nuestros países.



Foto 3. Conferencia **Actualidad y métodos de diagnóstico de virosis respiratorias**, a cargo de la Dra. Inmaculada Casas Flecha, investigadora de la Unidad de Virus Respiratorios y Gripe, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España. Fotografía tomada por personal de prensa del INDRE.

EL InDRE COMO REFERENCIA NACIONAL E INTERNACIONAL

LUCÍA HERNÁNDEZ RIVAS / lucia.hernandez@salud.gob.mx

Directora de Servicios y Apoyo Técnico, Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez” (InDRE), Dirección General de Epidemiología, México

El Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez” (InDRE) forma parte de la Dirección General de Epidemiología (DGE), la cual depende orgánicamente de la Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud de la Secretaría de Salud de México. La DGE coordina el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), el cual permite detectar los daños y riesgos para la salud de la población mexicana en materia de Salud Pública y uno de sus componentes importantes es la vigilancia a través de laboratorio.

El InDRE, coordina la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP), para la emisión de diagnósticos confiables y oportunos y es referencia en el ámbito nacional. La misión de Instituto es ofrecer productos y servicios de diagnósticos de Salud Pública confiables y oportunos, formación de recursos humanos, evaluación de la competencia técnica de la RNLSP y realizar investigación y desarrollo tecnológico en el ámbito de su competencia, que oriente la toma de decisiones en Salud Pública, así como generar información de alerta temprana y respuesta ante la presencia de enfermedades emergentes o reemergentes en el contexto nacional e internacional. El InDRE busca ser una institución líder con un ambiente de trabajo en equipo, con el fin de coadyuvar a disminuir la morbilidad y mortalidad de enfermedades de importancia en Salud Pública.

El Instituto funciona bajo la Administración de un Sistema Integrado de Gestión (Calidad y Bioseguridad), con tres macroprocesos: estratégicos, sustantivos y habilitadores. Dentro de los procesos estratégicos está la planificación, liderazgo, evaluación del desempeño y mejora. En los procesos sustantivos está a) el diagnóstico, con sus subprocesos de la fase preanalítica, analítica y postanalítica, con el fin de garantizar un informe de prueba confiable y oportuno; b) la formación de recursos humanos de la RNLSP, en el que se lleva a cabo la detección de necesidades de capacitación, elaboración y validación de programa de cursos y la impartición y eficacia de los cursos, lo cual permite contar con recursos humanos fortalecidos en lo técnico y gerencial; c) evaluación de la competencia técnica de la RNLSP, en el que se lleva a cabo la evaluación del desempeño y su análisis correspondiente, para la elaboración de reconocimientos a la competencia técnica a los laboratorios que conforman la Red; d) servicios auxiliares de diagnóstico, en el que se realiza la aceptación de solicitudes de evaluación de pruebas diagnósticas comerciales, la evaluación de las mismas y la emisión de resultados, esto permite contar con estuches de diagnóstico con parámetros de desempeño óptimos para el diagnóstico. Todo lo anterior con sus procesos habilitadores dentro de los que se encuentra: coordinación de la Red, gestión ambiental, recepción de muestras, informática, evaluación de la competencia técnica, bioterio, diagnóstico y tipificación molecular, gestión para la capacitación, laboratorio de bioseguridad nivel 3, diseño y publicaciones, adquisiciones, inventarios, recursos humanos, asesoría jurídica, servicios generales, almacén general, mantenimiento integral y conservación, ingeniería de equipo médico y laboratorio, recursos financieros, protección civil, laboratorios internos de apoyo al diagnóstico, entre otros.

Antecedentes

El InDRE inició como el Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales (ISET) en 1939, el Dr. Manuel Martínez Báez fue el principal fundador del ISET. En 1985 se fortaleció la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública y en 1989 el ISET cambió su denominación al de Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr Manuel Martínez Báez”. El 7 de abril de 2014 fueron inauguradas las nuevas instalaciones del InDRE.

Dentro de los logros institucionales, está:

Crecimiento sostenido de la RNLSP

Acreditación y Recertificación de los procesos del InDRE del sistema de gestión de calidad con base en las normas ISO 15189:2022 “Laboratorios Clínicos. Requisitos de la Calidad y competencia”; ISO 9001:2015 “Sistemas de Gestión de Calidad- Requisitos” e ISO 35001:2019 “Gestión de Riesgo Biológico en laboratorio y otra Organizaciones relacionadas
Cumplimiento de indicadores de desempeño (oportunidad y confiabilidad)

Fortalecimiento de la RNLSP

Centros Colaboradores WHO para Bioseguridad, Calidad, Malaria y Arbovirus a nivel Latinoamericano.

Forma parte de la Red de Laboratorios de Respuesta ante Bioterrorismo (LRN- Laboratory Response Network) de los Centros para el Control de Enfermedades (CDC) de los EUA.

Laboratorio Supranacional de Tuberculosis OPS/OMS desde 2016.

Centro Nacional de Influenza por la OMS

Laboratorio Regional de Vigilancia Genómica para SARS-CoV-2.

Formamos parte de la Global Health Security Action Group Laboratory Network (GHSAG-LN)

Integrantes de la Vigilancia Genómica del Virus Dengue en América (VIGENDA) y de la red de vigilancia regional de enfermedades transmitidas por alimentos (PulseNet).

Formamos parte de la red de “Laboratorios de Tuberculosis de la Región de las Américas” del Organismo Andino de Salud (ORAS-CONHU) como Laboratorio Supranacional de Tuberculosis.

La Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP)

Es el conjunto de laboratorios para la vigilancia epidemiológica, relacionados entre sí, con objetivos específicos que permiten unificar: métodos de diagnóstico, criterios de interpretación de resultados, transferencia tecnológica, generación de conocimiento, y formación de recursos humanos. Lo anterior, permite garantizar procedimientos técnico-administrativos que produzcan información de laboratorio de calidad para la oportuna toma de decisiones de Salud Pública en cuanto a enfermedades sujetas a vigilancia epidemiológica. Está conformada por: El Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (Institución rectora), 31 Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP), uno por cada entidad federativa a excepción de la Ciudad de México, cuyas muestras son procesadas en el InDRE y cinco Laboratorios de Apoyo a la Vigilancia Epidemiológica (LAVE) en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, Hospital General de México, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre y el Centro Médico Nacional La Raza.

La RNLSP realiza Vigilancia Epidemiológica basada en Laboratorio mediante un Marco Analítico Básico (MAB) conformado de 31 padecimientos; para que un diagnóstico sea considerado en el MAB debe de cumplir con:

Soporte Documental: que exista una Norma Oficial Mexicana para la prevención y control del mismo, que cuente con un Programa de Acción Específico en el que estén explícitos, los objetivos y metas a cumplir; que esté considerado como un Sistema Especial de Vigilancia Epidemiológica en la NOM-017-SSA2-2012 Para la Vigilancia Epidemiológica y que cuente con Lineamiento de Vigilancia por Laboratorio.

Criterios epidemiológicos: incidencia $\geq 0.5/100,000$ habitantes, demanda diagnóstica, padecimientos en erradicación o eliminación

Capacidad de la RNLSP: competencia y capacidad en el laboratorio, evaluación del desempeño: control de calidad y/o panel de eficiencia.

Los 31 padecimientos considerados en el MAB con lineamientos de laboratorio emitidos por el InDRE, son: enfermedad de Chagas, Leishmaniasis, Paludismo, Dengue, Chikungunya, Zika, Entomología, Brucelosis, Leptosirosis, Rabia, Tuberculosis, Cólera (alimentos y humanas), Salmonelosis, Shigelosis, virus de la Influenza, identificación de *Haemophilus influenzae*, Meningococo, Neumococo, Rotavirus, Rubéola, Sarampión, Tos ferina, VIH, Hepatitis A, B, y C, Sífilis, Cáncer Cérvico-Uterino, Rickettsiosis y SARS-CoV-2.

Evaluación del Desempeño de la RNLSP

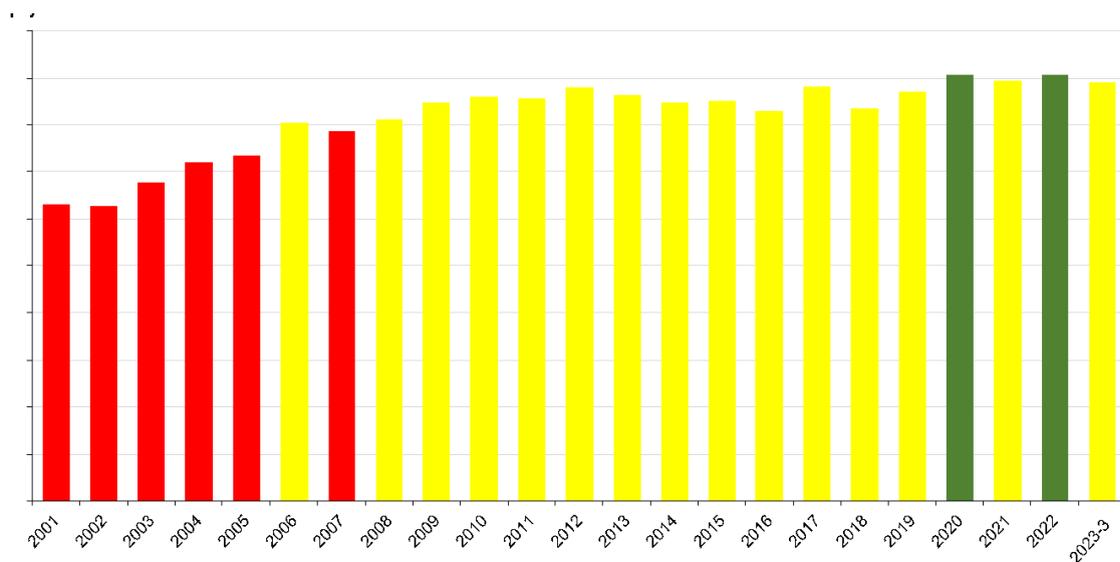
Para poder medir la operación de la RNLSP se cuenta con indicadores de evaluación que permiten calcular su desempeño, estos han sido construidos y evaluados desde el año 2001 a la fecha actual; es importante destacar que dicho proceso de evaluación es dinámico y por ello está sujeto a revisiones periódicas, de tal manera que se va adecuando a las circunstancias siempre cambiantes del contexto epidemiológico, tecnológico y operativo. El objetivo de la evaluación del desempeño es garantizar resultados confiables y oportunos, así como identificar áreas de mejora del proceso.

Los indicadores abarcan los procesos de laboratorio que intervienen en el diagnóstico, los cuales son: concordancia, cumplimiento, confiabilidad (ensayos de aptitud), y supervisión de la competencia técnica. El indicador de concordancia permite evaluar la proporción de muestras confirmadas por el InDRE con el resultado emitido en el total de muestras enviadas y procesadas por los LESP. El indicador de cumplimiento indica la proporción de muestras para control de calidad recibidas en el InDRE con la calidad y cantidad requeridas, con diagnóstico ratificado del total de muestras reportadas. El indicador de evaluación de confiabilidad, se lleva a cabo con la evaluación del desempeño de los participantes con respecto a criterios previamente establecidos mediante comparaciones interlaboratorio a través de ensayos de aptitud, sobre el mismo ítem o ítems de acuerdo con condiciones predeterminadas. El indicador de supervisión de la competencia técnica, permite evaluar el cumplimiento a los criterios mínimos que deben cumplir los laboratorios que forman parte de la RNLSP como se establece en la actualización de la Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2- 2012, para la vigilancia epidemiológica, así como los lineamientos para la vigilancia epidemiológica basada en laboratorio de los diagnósticos que conforman el Marco Analítico Básico sujeto a evaluación.

El indicador de supervisión a la competencia técnica se mide de forma anual y representa el 40% de la calificación global de la Evaluación del Índice de Desempeño; el 60% restante se toma de la calificación obtenida para las evaluaciones anuales de concordancia, cumplimiento y confiabilidad (20% cada uno).

La evaluación del Índice de Desempeño identifica áreas de oportunidad en la operación de los Laboratorios Estatales de Salud Pública para tomar acciones que conlleven, a la mejora a través de los indicadores de concordancia, cumplimiento, confiabilidad y supervisión de la competencia técnica. El reto es mantener o incrementar el índice de desempeño nacional año con año, la meta planteada para el periodo de 2019 a 2024 fue cumplir con una meta > o = a 85%, lo cual como se puede observar en la gráfica siguiente se ha cumplido en el periodo de tiempo referido.

**Índice de Desempeño Nacional de la RNLSP
2001-2023-3er Trimestre**



Asimismo, y aunado a todo lo anterior, la DGE/InDRE es reconocida como una Instancia de Seguridad Nacional, lo cual está publicado en el Diario Oficial de la Federación en la publicación del 05 de agosto de 2013 en:

https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5309070&fecha=05/08/2013#gsc.tab=0,

dado que sus atribuciones se encuentran relacionadas directamente con amenazas y riesgos de Seguridad Nacional y la información que administra contribuye a la generación de inteligencia estratégica para la toma de decisiones, y conlleva de manera inmediata y directa a mantener la integridad, estabilidad y permanencia del Estado Mexicano.

El InDRE y su Labor Diagnóstica ante Nuevas Enfermedades Transmisibles

El InDRE es un pilar en la respuesta ante eventos que ponen en riesgo la salud de los mexicanos, destaca su rectoría a nivel nacional y su colaboración en las Américas en el marco del diagnóstico durante la pandemia por COVID-19 (causada por SARS-CoV-2), la Infección por Virus de la Viruela del Mono (Orthopoxvirus), y casos de meningitis de etiología micótica por *Fusarium solani*.

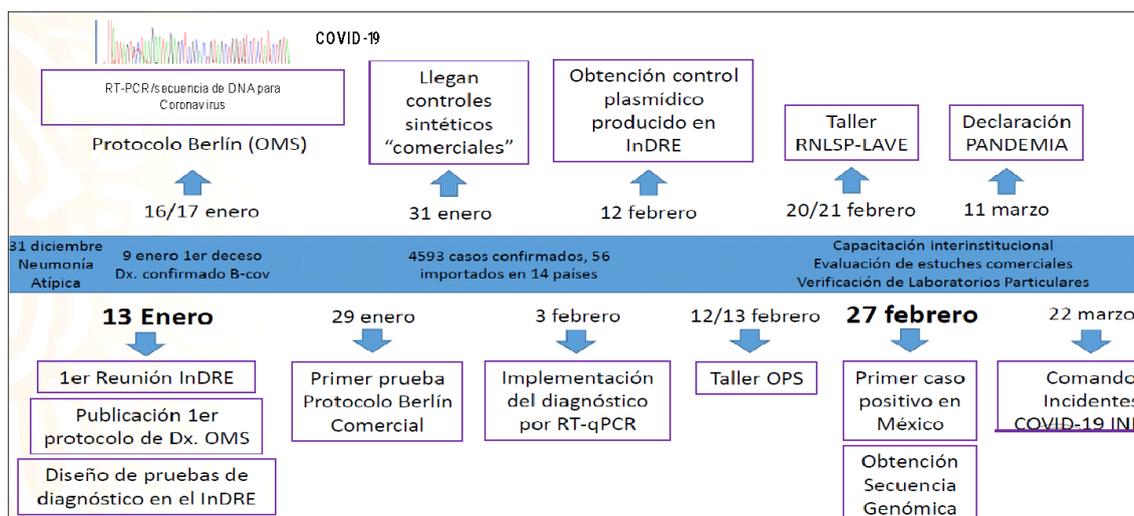
El mantener al recurso humano de la RNLSP actualizados y transfiriendo la metodología de vanguardia ha permitido dar la cobertura diagnóstica de los principales padecimientos de importancia en Salud Pública en México y aquellos emergentes y re emergentes que han surgido en este periodo, es de destacar el compromiso y la experiencia que ha adquirido el

personal del InDRE y la RNLSP que fue demostrado durante la pandemia por SARS-CoV-2, con jornadas laborales mayores a horarios de trabajo, días festivos y sin vacaciones.

Durante la pandemia de COVID-19 por SARS-CoV-2 se desarrolló:

- Un método para detección de coronavirus para el diagnóstico molecular de SARS-CoV-2.
- Evaluación de más de 80 estuches comerciales de diagnóstico por RT-PCR.
- Análisis de la funcionalidad de más de 15 estuches de extracción de ácidos nucleicos.
- Validación de los Métodos de Diagnóstico para COVID-19 en el InDRE implementado por la OMS.
- Participación de la Vigilancia Genómica de SARS CoV-2 en las Américas.
- Estandarización de una técnica de PCR dúplex Flu-SARS.
- Desarrollo de un Método de RT-PCR Secuencia capilar para detección de variantes de SARS-CoV-2.
- Implementación de la evaluación estuches comerciales de diagnóstico por Antígeno para el virus de SARS-CoV-2.
- Implementación de la Vigilancia Genómica de SARS CoV-2 en México.
- Secuenciación de más de 130,000 genomas completos depositados en la plataforma de GISAID.
- Publicación de artículos en revistas indizadas.

Línea de Tiempo para la Preparación y Respuesta ante la Pandemia por SARS-CoV-2



En el año 2022 ante la emergencia de casos en humanos por el Virus de la Viruela del Simio, México preparó un plan de acción para atención a casos sospechosos. Se llevó a cabo la estandarización, validación e implementación del método para el diagnóstico por laboratorio de MPox, basado en el protocolo sugerido por OPS (Li et al., Journal of Virological Methods 169, 223–7, 2010); con el cual se dio atención a las ESPII por MPox, dentro de lo que se destaca:

- Implementación del Diagnóstico de MPox en el InDRE y control de calidad.
- Verificación de bioseguridad y biocustodia y capacidad instalada para la detección del virus de viruela símica (MPXV) en laboratorios de la RNLSP.
- Elaboración y publicación de lineamientos para la vigilancia por laboratorio del virus de viruela símica.

Organización del “Taller de Diagnóstico y Detección por Laboratorio del Virus de la Viruela del Simio” en la Ciudad de México-IndRE.
Regionalización del Diagnóstico de Viruela Símica.

Dada la presencia de brotes de meningitis micótica en personas que se realizaron procedimientos con anestesia epidural en los Estados de Durango (2022) y Tamaulipas (2023), se realizó:

Supervisión al Laboratorio de Biología Molecular del Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Durango y Tamaulipas.

Coordinación intersectorial.

Implementación de la técnica de detección de *Fusarium solani* por RT-PCR.

Realización del Control de Calidad de los resultados de la detección de *F. solani* emitidos por estos dos LESP.

Con todo lo anterior, se concluye que la DGE/IndRE contribuyen a la respuesta ante cualquier enfermedad emergente, reemergente, en vías de eliminación, erradicación o sujeta a vigilancia epidemiológica, de acuerdo a lo establecido en la NOM-017-SSA2-2012, para la vigilancia epidemiológica, para poder salvaguardar la salud de la Población Mexicana.

Dra. Inmaculada Casas Flecha, investigadora de la



Foto 4. *Panel superior:* Instantáneas tomadas durante la Dinámica Grupal, coordinada por Rosalba Pérez Meza. *Panel inferior:* Instantáneas tomadas durante la preparación de la foto grupal y la conferencia a cargo de la Dra. Sandra Goñi, Coordinadora COVIReD. Fotografía tomada por personal de prensa del IndRE.

La aparición y caracterización de brotes de enfermedades sistémicas o neurológicas emergentes y reemergentes de diferente magnitud, como así mismo las infecciones virales endémicas, forman parte de nuestra realidad cotidiana y constituyen una constante amenaza. Una importante cantidad de virus emergentes o reemergentes son arbovirus (*arthropod borne virus*, por virus transmitidos por artrópodos) entre los cuales cobran especial relevancia los miembros del género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*.

Entre los *Flavivirus* podemos encontrar un gran número de especies reconocidas taxonómicamente, muchos de los cuáles son importantes patógenos para las personas. Es importante destacar que los integrantes de este género presentan mecanismos de replicación y organización genómica muy similares, aunque el rango de hospedador y la transmisibilidad muestran diferencias. En cuanto a los ciclos en la naturaleza, muchos arbovirus poseen hospedadores vertebrados y pueden ser transmitidos por varios vectores. Debido a que estas arbovirosis presentan un bajo o nulo impacto en estos hospedadores vertebrados primarios, este ciclo se vuelve evidente cuando los humanos son alcanzados por los vectores enzoóticos naturales, o cuando los humanos son expuestos a un virus que ha escapado de su ciclo de transmisión zoonótico primario vía un vector secundario u hospedador vertebrado. De esta forma, los flavivirus pueden dividirse en cuatro grupos ecológicos: transmitido por mosquitos, transmitido por garrapatas, grupo específico de vertebrados, y los que han sido aislados de insectos. Los grupos que presentan mayor impacto en la salud humana son principalmente los que son transmitidos por mosquitos y por garrapatas. Asimismo, dentro del primer grupo, podemos encontrar una subdivisión de acuerdo a la especie de mosquito que actúa como vector en la transmisión de estos virus: los grupos que son transmitidos a través de mosquitos *Aedes sp.* y los que lo hacen mediante diferentes especies de *Culex sp.* En la mayoría de las instancias, las personas son consideradas hospedadoras “*dead-end*” debido a que la viremia desarrollada es insuficiente para infectar eficientemente otros artrópodos y, por lo tanto, no contribuyen a los ciclos de transmisión arboviral (como el virus de la encefalitis de *Saint Louis* -SLEV- y el virus de *West Nile* -WNV-). Sin embargo, los virus dengue (DENV), de la fiebre amarilla (YFV) y Zika (ZIKV) causan viremia suficiente en humanos para permitir la transmisión directamente entre humanos a través de mosquitos *Aedes* en ciclos urbanos.

Si analizamos la clasificación serológica, los grupos que pueden identificarse son siete: Dengue, Fiebre Amarilla, Encefalitis Japonesa, Aroa, Kokobera, Ntaya y Spondweni. La relación de cada uno de estos grupos con un género único de mosquitos no es tan directa, ya que, dependiendo de la localización geográfica y el momento epidemiológico, pueden ser transmitidos por ambos géneros.

Ante este escenario tan diverso, la propuesta de este panel abarca desde la importancia de vigilar activamente la presencia de WNV o el virus Usutu (USUV) en España y en toda Europa, la necesidad de contar con herramientas moleculares y estrategias para los virus Oropuche (OROV) y Mayaro (MAYV) en las Américas, donde están generando brotes epidémicos no registrados anteriormente en Brasil, cuestión que además nos obliga a revisar y repensar las estrategias de diagnóstico diferencial.

Los y las invitamos a recorrer las propuestas de abordajes que nos comparten Ana Vázquez desde el Área de Virosis Importadas del Instituto de Salud Carlos III en España, Felipe Naveca desde el Laboratório de Arbovírus e Vírus Hemorrágicos del Instituto Oswaldo Cruz en Brasil, y Victoria Luppo del Instituto de Enfermedades Virales y Humanas (INEVH) del ANLIS-Malbrán de Argentina.

VIRUS NEUROTRÓPICOS EN ESPAÑA Y EUROPA (WNV Y USUV)

ANA VÁZQUEZ / A.VAZQUEZ@isciii.es

Laboratorio de Arbovirus y Enfermedades Víricas Importadas, Centro Nacional Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.

En los últimos años se ha visto una emergencia de los arbovirus a nivel mundial. En España y Europa, los arbovirus neurotrópicos endémicos más importantes pertenecen a los géneros *Phlebovirus* y *Orthoflavivirus*. En Europa están presentes los flavivirus West Nile y Usutu (transmitidos por mosquitos del género *Culex*) y la encefalitis transmitida por garrapatas (ETG), pero además el flebovirus Toscana (transmitido por flebótomo). Pero además se han descrito nuevos virus relacionados en los vectores y/o hospedadores, cuya patogenicidad en humanos es aún desconocida.

Uno de los arbovirus neurológicos más importantes presentes en Europa y España, es el virus West Nile (VWN), responsable de importantes brotes en humanos desde el año 2010 y donde desde entonces, están circulando los linajes 1 y 2 del virus. Pertenece al género *Orthoflavivirus*, que incluye otros virus como el de la fiebre amarilla, dengue, usutu, encefalitis japonesa o encefalitis de San Luis. El VWN es un arbovirus zoonótico, lo que implica que se transmite al ser humano mediante artrópodos (mosquitos del género *Culex*) desde un reservorio animal (aves). El ser humano y el caballo, son hospedadores accidentales y fondo de saco epidemiológico, sin capacidad de transmitir el virus a mosquitos, debido a que en ellos la viremia es corta y de bajo nivel. La mayoría de las infecciones por el VWN en los seres humanos son asintomáticas; sólo entre un 20% y 40% desarrollan enfermedad clínica, y en unos pocos casos (<1%) la infección se manifiesta como enfermedad neuroinvasiva. La recuperación suele ser completa y la infección confiere inmunidad duradera. Desde 2010, en Europa se observa una expansión geográfica con una marcada estacionalidad (julio-noviembre). Los países europeos con mayor incidencia son Grecia, Italia, Rumanía y Hungría. El linaje 1 está distribuido ampliamente en todos los continentes y es el que circulaba en Europa, hasta que en 2004 se identificó el linaje tipo 2 del virus en Hungría, causando gran incidencia en aves, caballos y humanos en Austria y Hungría en 2008. En 2010, en Grecia, 197 personas desarrollaron enfermedad neuroinvasiva debido al linaje 2 causando 35 muertes. En la actualidad el linaje 2 es responsable de muchos de los casos en humanos en Europa. En España, la presencia del VWN se conoce de forma retrospectiva desde finales de los años noventa. El primer caso humano en España se publicó en 2007 en una persona que había estado en Badajoz en 2004. Posteriormente se diagnosticaron 2 casos en Cádiz en el año 2010 y 3 en Sevilla en el 2016. En el 2020, se detectó un brote en humanos con 77 casos humanos, de los cuales el 97% cursaron con meningoencefalitis y 8 de ellos fallecieron. En las temporadas 2021-2022 el número de casos ha sido menor, con un total de 6 y 4 casos humanos autóctonos respectivamente, todos ellos con clínica de meningoencefalitis. Durante la temporada 2023 se registraron 20 casos humanos, 19 de ellos autóctonos, de los cuales 8 casos ocurrieron en zonas donde nunca antes se habían descrito. Gracias a los estudios llevados a cabo para el VWN, se ha podido detectar en España otro flavivirus muy relacionado, el virus Usutu (VUSU). Es un virus emergente en Europa desde 2001, habiéndose detectado en mosquitos, pájaros, caballos y humanos, provocando casos neurológicos en humanos y mortalidad en aves. En España se ha detectado el VUSU en mosquitos de diferentes

Comunidades desde el año 2006 y en aves con síntomas neurológicos, observándose además la presencia de anticuerpos neutralizantes en animales (aves y/o caballos). Muchas de las zonas en las que se ha detectado, son zonas endémicas para el VWN también.

El virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (*Tick-borne encephalitis virus*, VTBE) es un flavivirus zoonótico endémico en diferentes países de Europa y que puede producir encefalitis en humanos. En Europa se transmite por la garrapata *Ixodes ricinus*, presente en casi toda España, aunque el virus no es endémico en el país de momento. La infección por VTBE ha sido un problema de salud pública cada vez mayor en Europa en los últimos 20 años, excepto en países con vacunación intensiva. Se ha informado una expansión de las áreas de riesgo en nuevas regiones (Dinamarca, Francia, Noruega, y Países Bajos). En 2016, se confirmaron en Europa, 2.674 casos (0,6 casos por 100.000 habitantes), estando el 1,4% (n = 37) asociados con viajes. En España se están detectando en los últimos años casos humanos importados de diferentes países europeos, como Italia, República Checa o Alemania. En estos casos, el diagnóstico se realizó por la detección de anticuerpos IgM e IgG frente a VTBE, confirmados por neutralización viral. Solo un caso mostró además reactividad IgG frente a VWN y VUSU, sin confirmación por neutralización. No pudo detectarse genoma viral en las muestras analizadas.

Los resultados destacan la importancia del uso de diferentes métodos de diagnóstico (moleculares y serológicos), en función de la evolución de la muestra, así como del diagnóstico diferencial frente a diferentes flavivirus endémicos en el área de estudio. La baja viremia que produce el virus y el tiempo de evolución de la enfermedad son la causa más probable del resultado negativo de los ensayos moleculares. En los últimos años, se ha detectado en Europa una emergencia del virus, por lo que se debe considerar el VTBE como posible causa de enfermedad neurológica en viajeros. Las personas que viven o viajan a regiones donde el virus es endémico deben ser conscientes del riesgo de exposición a las garrapatas, protegerse contra las picaduras o incluso valorar la inmunización si el riesgo de exposición es muy elevado.

Estos tres flavivirus (VWN, VUSU y VETG) pueden producir enfermedad neurológica en humanos, siendo VWN y VETG de declaración obligatoria, estando incluidos en la lista de enfermedades transmitidas por vectores que deben ser monitoreadas en Europa.

Por último, el otro arbovirus endémico en Europa y España que produce infección neurológica, es el virus Toscana (VTOS), el cual pertenece al género *Phlebovirus*, familia *Phenuiviridae*. Dicho género comprende 10 especies y más de 100 virus antigénicamente diferentes y se divide a su vez en 3 grupos: los transmitidos por mosquitos, por flebótomos y el grupo Uukuniemi, transmitido por garrapatas. Los flebovirus transmitidos por flebótomos (FTF), que circulan por la región del Mediterráneo, en general, producen asintomáticas y, en ocasiones, originan un síndrome febril de 3-7 días de duración que se ha denominado «fiebre de papatasi», con una sintomatología similar a la gripe.

La enfermedad neuroinvasiva se ha descrito, casi únicamente, asociada a la infección por el virus Toscana. El pronóstico generalmente es bueno, sin secuelas, aunque se han descrito casos de encefalitis grave, cefalea persistente, hipoacusia, alteraciones de la personalidad permanentes, bajo nivel de consciencia prolongado con convulsiones, hidrocefalia y afasia o paresias persistentes durante meses tras la fase aguda.

La detección de casos más habituales, en el caso del virus Toscana, es la esporádica. El resto de los FTF, debido a que los síntomas son leves, se suelen detectar exclusivamente cuando se presentan en forma de brotes. Hasta la fecha, se considera que son enfermedades exclusivamente humanas. En España se tienen indicios de la presencia de virus Toscana, Granada, Nápoles, Sicilia, Arbia y Arrabida-like en humanos, animales y

flebótomos, aunque solo se han identificado casos humanos asociados a los virus Toscana y Granada. La primera descripción de la presencia de FTF en España se debe a un caso clínico de infección por VTOS en un turista sueco que había visitado Cataluña. Desde entonces, el virus ha sido detectado en casos esporádicos de meningitis o meningoencefalitis en residentes de las comunidades de Cataluña y Murcia, así como en viajeros que habían visitado Andalucía y la costa mediterránea. La presencia del virus se ha demostrado también mediante estudios de detección de anticuerpos, con una prevalencia media que oscila, según los estudios, entre el 5 y el 26%, con diferencias regionales. Del mismo modo, se ha descrito una exposición importante al virus Toscana en animales domésticos y se ha demostrado la presencia de virus Toscana en el vector.

La ausencia de pruebas diagnósticas específicas para algunos de estos virus, junto con la escasa sospecha clínica entre los profesionales sanitarios en el momento actual, contribuye a que un gran porcentaje de casos no se detecten, dificultando de este modo la toma de medidas de control. Esto, a su vez, podría aumentar la probabilidad de transmisión.

Fuentes de financiamiento y participación en Redes

Instituto de Salud Carlos III, Agencia Española de Investigación, Evd-LabNet, CIBERESP (CIBER de Epidemiología y Salud Pública).

MAYARO Y OROPUCHE: UN RIESGO LATENTE

FELIPE NAVECA / felipe.naveca@fiocruz.br

Núcleo de Vigilância de Vírus Emergentes, Reemergentes ou Negligenciados – ViVER/EDTA.
Instituto Leônidas e Maria Deane, Fiocruz Manaus y Laboratório de Arbovírus e Vírus Hemorrágicos, Fiocruz Rio de Janeiro, Brazil

Os vírus transmitidos por artrópodes (arbovírus) estão entre as causas mais importantes de doenças infecciosas emergentes ou reemergentes em todo o mundo. Além da grande preocupação com as infecções por Dengue, Zika e Chikungunya, dados epidemiológicos que mostram o surgimento de outros dois arbovírus, conhecidos como Mayaro (MAYV) e Oropouche (OROV), sugerem que esses vírus merecem atenção especial, especificamente na região Norte do Sul América (Mourão *et al.* 2009, Vasconcelos *et al.* 2009, Bastos *et al.* 2012, Cardoso *et al.* 2015).

MAYV é um membro do gênero *Alphavirus* da família *Togaviridae*; está intimamente relacionado ao vírus Chikungunya e, desde sua descrição inicial, o MAYV tem sido associado a casos de doença autolimitada, apresentando febre, erupção cutânea e artralgia grave como sintomas mais comuns (Azevedo *et al.*, 2009, Abad-Franch *et al.*, 2012, Mourão *et al.*, 2012). OROV pertence à espécie *Orthobunyavirus oropoucheense*, gênero *Orthobunyavirus*, da família *Peribunyaviridae*, e está frequentemente associado a surtos de doença febril aguda semelhante à dengue.

Durante vários anos, a febre Oropouche foi considerada a segunda arbovirose mais comum no Brasil, superada apenas pela dengue (Figueiredo 2007, Vasconcelos *et al.* 2011). Portanto, no contexto da cocirculação de diferentes arbovírus, o diagnóstico adequado da doença febril aguda, baseado apenas no exame clínico, torna-se ainda mais difícil. O vírus Oropouche (OROV) é um patógeno transmitido por artrópodes. Este vírus é mantido na natureza em um ciclo silvestre que ainda precisa ser bem definido. No entanto, há evidências da participação de mosquitos florestais como *Aedes serratus* e *Coquillettidia venezuelensis* e de mamíferos como preguiças e primatas não humanos como reservatórios principais. Por outro lado, os mosquitos picadores (*Culicoides paraensis*) são considerados o principal vetor do ciclo urbano, embora os mosquitos *Culex quinquefasciatus* já tenham sido implicados na transmissão do OROV (Travassos da Rosa *et al.*, 2017). Nos últimos 70 anos, pelo menos 30 surtos humanos de OROV foram relatados em países latino-americanos (Brasil, Peru, Colômbia, Guiana Francesa e Panamá). Devido ao ressurgimento recorrente do OROV nas populações humanas da região amazônica e ao notável aumento na incidência e distribuição geográfica das infecções relatadas por OROV nos últimos anos, é uma das ameaças arbovirais emergentes mais significativas na América Latina (Wesselmann *et al.*, 2024).

Até o surgimento dos vírus chikungunya (CHIKV) e Zika (ZIKV) entre 2014-2015, o OROV era o arbovírus com maior incidência no Brasil, superado apenas pelo vírus da dengue (DENV) (Figueiredo, 2007). O maior surto documentado de OROV no país foi relatado no final da década de 1970, onde as estimativas apontam para mais de 100.000 casos humanos (Sakkas *et al.*, 2018), mas a verdadeira carga da doença induzida por OROV permanece desconhecida porque as medições diretas da incidência na população humana não foram realizadas e raramente foram realizadas durante outros surtos e períodos

interepidêmicos devido à vigilância sistemática limitada ou inexistente. Além disso, apesar de uma longa história de surtos, o número de genomas completos de OROV obtidos no Brasil desde sua primeira identificação em 1960 é escasso (n = 44) e principalmente restrito a apenas dois estados da região leste da Amazônia (Pará e Amapá), dificultando a compreensão da dinâmica evolutiva e de disseminação deste arbovírus (Gutiérrez *et al.*, 2020). Assim há uma necessidade crucial de expandir e fortalecer a capacidade de detecção e sequenciamento para melhorar nossa compreensão da evolução molecular, da dinâmica de transmissão e da carga de doença do OROV na região amazônica.

Aqui, relatamos evidências epidemiológicas e moleculares/genômicas de surtos de OROV em grande escala ocorridos em quatro estados brasileiros da região oeste da Amazônia entre 2022 e 2024: Amazonas (AM), Acre (AC), Rondônia (RO) e Roraima (RR). Quase 1.000 indivíduos testaram positivo para OROV e 75 novos genomas completos de OROV foram gerados a partir desses surtos recentes na região amazônica brasileira. Nossas descobertas revelaram que recentes surtos brasileiros resultaram da transmissão sustentada e disseminação de uma nova linhagem recombinante de OROV.

Para entender a origem e disseminação do OROV que impulsiona surtos recentes na região amazônica brasileira, sequenciamos genomas completos de OROV com uma estratégia baseada em amplicons projetada por nosso grupo usando Primal Scheme (Quick *et al.*, 2017), uma versão modificada de Primer3 (Untergasser *et al.*, 2012) incorporado em Geneious Prime 2023.2.1, e Illumina COVIDSeq como a base para uma estratégia de sequenciamento do genoma completo mais econômica para um conjunto maior de amostras (sequências de Primers OROV disponíveis mediante solicitação). Sequenciamos genomas completos de OROV de 75 pacientes residentes em 18 cidades dos estados brasileiros de AM (n = 37), RO (n = 20), RR (n = 12) e AC (n = 6), coletados entre 30 de agosto de 2022 e 12 de dezembro de 2023 (Fig. 1a). As 75 sequências de OROV completas dos segmentos genômicos S, M e L geradas neste estudo foram alinhadas com segmentos correspondentes de todas as sequências completas do genoma de OROV publicadas disponíveis no NCBI (n = 72), amostradas nas Américas entre 1955 e 2021, e com as sequências protótipo de OROV (OROV L: AF484424; M: AF441119; S: AY237111), vírus Iquito (IQTVP L: KF697142; M: KF697143; S: KF697144), vírus Perdoes (PEDVP L: KP691627; M: KP691628; S: KP691629) e vírus Madre de Dios (MDDVP L: KF697147; M: KF697145; S: KF697146). Todos estes vírus são classificados na espécie *Orthobunyavirus oropoucheense*, tendo o OROV como o vírus referência da espécie. Os conjuntos de dados resultantes foram usados para inferir árvores filogenéticas usando a estrutura estatística Bayesiana de MrBayes 3.2 (Ronquist *et al.*, 2012).

A discordância filogenética entre os segmentos genômicos é consistente com a ocorrência de sucessivos eventos de rearranjo ao longo da linha do tempo evolutiva do OROV na América do Sul, conforme esquematicamente representado na Figura 1. De acordo com esta hipótese, o clado OROVBR-2015-2023 que atualmente está se espalhando no Brasil foi identificado como um vírus recombinante M1L2S2 que adquiriu o segmento M do clado OROVBR-2009-2018 (M1L2S3) e os segmentos L+S do clado OROVPE/CO/EC-2008-2021 (M2L2S2), que vem circulando na bacia amazônica desde o final dos anos 2000.

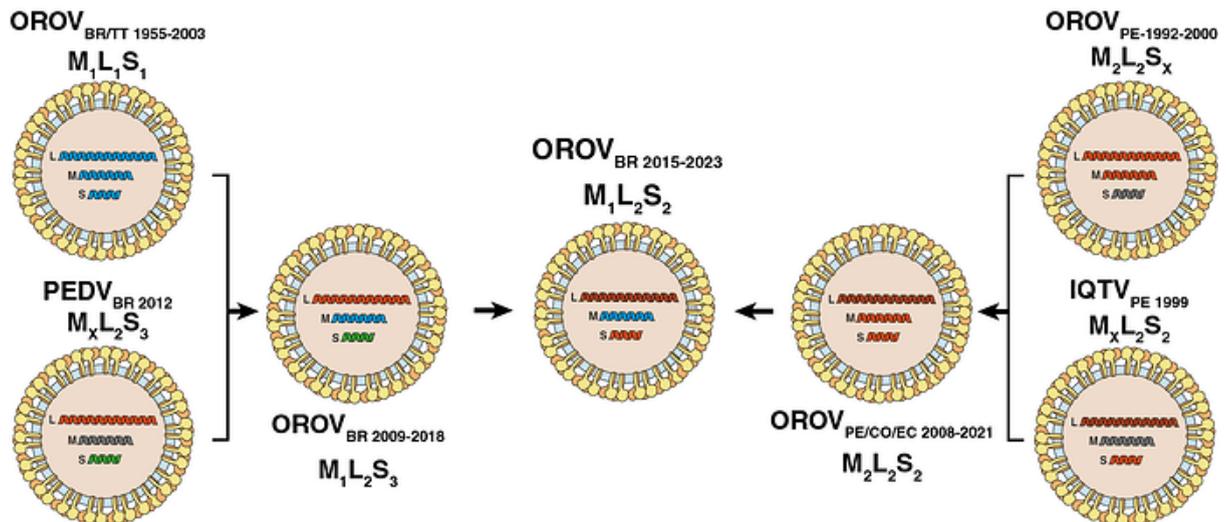


Figura 1. Supostos eventos de rearranjo que geraram a atual diversidade genômica de OROV na América do Sul. Cada segmento genômico do OROV é colorido de acordo com a linhagem identificada neste estudo. As ilustrações foram obtidas da SwissBioPics (<http://viralzone.expasy.org/> 5, (13)) e modificadas para se alinharem com a hipótese de eventos de rearranjo. Vírus Oropouche (OROV), vírus Iquito (IQTV), vírus Perdoes (PEDV).

Essas descobertas revelaram que a manutenção e disseminação durante um ano de uma nova linhagem recombinante de OROV na região amazônica brasileira estava associada ao recente aumento de casos de OROV em grandes centros urbanos como Manaus. Esse achado, combinado com a recente identificação de casos importados de OROV+ em São Paulo (um paciente vindo do AM) e Curitiba (dois pacientes, um do AM e outro do AC) (dados não publicados), levanta preocupações sobre o risco de disseminação e estabelecimento desse arbovírus negligenciado em áreas urbanas fora da região amazônica. Mais estudos são necessários para avaliar o impacto potencial de eventos recentes de rearranjo no OROV na competência vetorial, gravidade da doença e transmissibilidade do vírus em populações suscetíveis de regiões não endêmicas. Nosso estudo também alerta sobre a necessidade urgente de implementação de testes de diagnóstico imunológico e moleculares, sensíveis e específicos, como o desenvolvido por nosso grupo (Naveca et al., 2017), em todos os estados brasileiros e talvez em outros países da América Latina, considerando a semelhança clínica entre infecções por OROV e outras doenças arbovirais febris agudas, endêmicas no Brasil causadas por DENV, ZIKV e CHIKV.

Agradecimentos

Os autores desejam agradecer a todos os profissionais de saúde dos estados brasileiros que lutam contra o atual surto de Oropouche. Agradecemos também o apoio dos membros da Rede de Vigilância Genômica COVID-19 da FIOCRUZ, da Coordenação Geral de Laboratórios (CGLab) do Ministério da Saúde (MS), dos Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACENs) do Brasil e das agências de vigilância sanitária do Acre, Amazonas, Rondônia e Roraima. Apoio financeiro Edital FAPEAM 04/2022/FIOCRUZ/FAPEAM/FAPERO - INOVAÇÃO NA AMAZÔNIA; Amazônia +10; Edital FAPEAM 023/2022 - INICIATIVA AMAZÔNIA +10; Rede Genômica de Vigilância em Saúde - REGESAM); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, e Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo.

Disponibilidade de dados

Todos os genomas OROV gerados e analisados neste estudo foram depositados no GenBank sob os números de acesso PP153945 a PP154172. Devido ao nosso compromisso com a saúde pública, solicitamos a liberação imediata desses genomas assim que a equipe do GenBank os processar. O acesso ao artigo completo no link:

<https://virological.org/t/emergence-of-a-novel-reassortant-oropouche-virus-drives-persistent-outbreaks-in-the-brazilian-amazon-region-from-2022-to-2024/955>

Em respeito aos métodos moleculares para detecção dos vírus Mayaro e Oropouche, veja o próximo artigo:

https://memorias.ioc.fiocruz.br/article/6287/0062_multiplexed-reverse-transcription-real-time-polymerase-chain-reaction-for-simultaneous-detection-of-mayaro-oropouche-and-oropouche-like-viruses

Bibliografia

- Travassos da Rosa JF, de Souza WM, Pinheiro F de P, Figueiredo ML, Cardoso JF, Acrani GO, et al. Oropouche Virus: Clinical, Epidemiological, and Molecular Aspects of a Neglected Orthobunyavirus. *Am J Trop Med Hyg.* 2017 May;96(5):1019–30.
- Wesselmann KM, Postigo-Hidalgo I, Pezzi L, De Oliveira-Filho EF, Fischer C, De Lamballerie X, et al. Emergence of Oropouche fever in Latin America: a narrative review. *Lancet Infect Dis.* 2024 Jan;S1473309923007405.
- Sakkas H, Bozidis P, Franks A, Papadopoulos C. Oropouche Fever: A Review. *Viruses.* 2018 Apr 4;10(4):175.
- Gutiérrez B, Wise EL, Pullan ST, Logue CH, Bowden TA, Escalera-Zamudio M, et al. Evolutionary Dynamics of Oropouche Virus in South America. Parrish CR, editor. *J Virol.* 2020 Feb 14;94(5):e01127-19.
- Naveca FG, Nascimento VA do, Souza VC de, Nunes BT, Rodrigues DSG, Vasconcelos PF da C. Multiplexed reverse transcription real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of Mayaro, Oropouche, and Oropouche-like viruses. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2017 Jul;112(7):510–3.
- Quick J, Grubaugh ND, Pullan ST, Claro IM, Smith AD, Gangavarapu K, et al. Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. *Nat Protoc.* 2017 Jun;12(6):1261–76.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012 Aug;40(15):e115.
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol.* 2012 May;61(3):539–42.
- Mourão MPG, Bastos MS, Gimaque JBL, Mota BR, Souza GS, Grimmer GHN, et al. Oropouche fever outbreak, Manaus, Brazil, 2007-2008. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15(12): 2063-4.
- Vasconcelos HB, Azevedo RSS, Casseb SM, Nunes-Neto JP, Chiang JO, Cantuária PC, et al. Oropouche fever epidemic in northern Brazil: epidemiology and molecular characterization of isolates. *J Clin Virol.* 2009; 44(2): 129-33.
- Bastos MS, Figueiredo LTM, Naveca FG, Monte RL, Lessa N, Figueiredo RM, et al. Identification of Oropouche Orthobunyavirus in the cerebrospinal fluid of three patients in the Amazonas, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2012; 86(4): 732-5.
- Cardoso BF, Serra OP, Heinen LBS, Zuchi N, de Souza VC, Naveca FG, et al. Detection of Oropouche virus segment S in patients and in *Culex quinquefasciatus* in the state of Mato Grosso, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015; 110(6): 745-54.
- Azevedo RSS, Silva EVP, Carvalho VL, Rodrigues SG, Nunes-Neto JP, Monteiro H, et al. Mayaro fever virus, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15(11): 1830-2.
- Abad-Franch F, Grimmer GH, de Paula VS, Figueiredo LTM, Braga WSM, Luz SLB. Mayaro virus infection in Amazonia: a multimodel inference approach to risk factor assessment. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(10): e1846.
- Mourão MPG, Bastos MS, Figueiredo RM, Gimaque JBL, Galusso EDS, Kramer VM, et al. Mayaro fever in the city of Manaus, Brazil, 2007-2008. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2012; 12(1): 42-6.
- Figueiredo LTM. Emergent arboviruses in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007; 40(2): 224-9.
- Vasconcelos HB, Nunes MRT, Casseb LMN, Carvalho VL, da Silva EVP, Silva M, et al. Molecular epidemiology of Oropouche virus, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17(5): 800-6.

ARBOVIRUS NEUROTRÓPICOS EN LAS AMÉRICAS: IMPORTANCIA DEL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Victoria Luppo / victorialuppo@yahoo.com.ar

Laboratorio de Arbovirus del Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas “Dr. Julio I. Maiztegui” (INEVH)-ANLIS-Pergamino, Argentina

María Alejandra Morales

Directora Asistente de Producción del Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas “Dr. Julio I. Maiztegui” (INEVH)-ANLIS-Pergamino, Argentina

Cintia Fabbri

Cintia Barulli

Noelia Jackel

Doraldina Casoni

Pablo Baroni

Mariel Feroci

Sofía Perrone

Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas “Dr. Julio I. Maiztegui” (INEVH), ANLIS-Pergamino, Argentina

Los alfavirus (familia *Togaviridae*) son responsables de varias enfermedades emergentes de importancia médica y son patógenos veterinarios importantes. Las comparaciones de secuencias genómicas permitieron organizar actualmente a esta familia viral en una combinación de complejos antigénicos y genéticos. Los virus de la Encefalomiелitis Equina del Este (EEEV), del Oeste (EEOV) y Venezolana (EEEV) constituyen ejemplos de complejos de esta familia que se encuentran en las Américas y pueden causar enfermedad tanto en el ser humano como en los équidos, originando encefalitis en muchos casos clínicos. Suelen mantenerse en la naturaleza alternando entre hospedadores vertebrados y mosquitos vectores.

La encefalitis causada por estos virus se produce de manera esporádica en caballos y humanos desde mediados de verano hasta finales de otoño en las regiones templadas, pero puede tener lugar durante todo el año en las zonas tropicales, si las condiciones climáticas favorecen más o menos la presencia del mosquito vector.

El EEEV es principalmente un patógeno en equinos de América Central y del Sur. Se han producido epizootias en equinos en Panamá, Brasil, Uruguay y Argentina, con altas tasas de ataque y mortalidad comparables a lo visto en América del Norte. Las infecciones humanas por EEEV rara vez se detectan en América del Sur. El ciclo descrito en América del Norte, incluye huéspedes humanos y animales domésticos sin salida que desarrollan enfermedades graves. En América del Sur, los ciclos de transmisión enzoótica del EEEV no

se conocen bien. La gran mayoría de los virus aislados provienen de mosquitos del subgénero *Culex* (*Melanoconion*), lo que sugiere que son los principales vectores enzoóticos.

Los virus del complejo EEEV son clasificados en 6 subtipos antigénicos. En Argentina circula el virus Rio Negro (VI) y el Pixuna (IV). El primero se aisló en 1980 de mosquitos en la provincia de Chaco y al año siguiente se produjo un brote en Isla Gral Belgrano, Formosa. También hay evidencias en la provincia de Córdoba. El virus Pixuna se detectó en mosquitos de Chaco y Tucumán. El ciclo descrito en los países donde se ha detectado circulación viral describe una transmisión enzoótica del VEEV entre roedores y otros vertebrados (p. ej., ratas alodoneras, ratas espinosas, murciélagos y zarigüeyas) como reservorios y mosquitos del subgénero *Culex* (*Melanoconion*) como vectores primarios. Por el contrario, las cepas epizooticas de VEEV son transmitidas por varios mosquitos vectores (p. ej., *Aedes* y *Psorophora* spp.) a huéspedes de amplificación susceptibles, los caballos. Durante los ciclos epizooticos o epidémicos, los caballos son huéspedes de amplificación eficientes con títulos altos de viremia para la transmisión de mosquitos con posibilidad de transmisión al hombre. La mortalidad es del 10-25% entre los pacientes hospitalizados con encefalitis y 0,2% de los casos sintomáticos. Debido a que es altamente incapacitante y extremadamente infeccioso a través de la ruta del aerosol, el VEEV estuvo altamente desarrollado como arma biológica durante la guerra fría y sigue siendo de importancia para la biodefensa. No se confirmó la infección por contacto directo entre caballos, o entre personas o del caballo a la persona, pero sí se reportaron exposiciones por aerosoles en el laboratorio.

Con respecto al EEOV, en América del Sur se han notificado pequeñas epizootias equinas en Guyana, Ecuador, Brasil, Argentina y Uruguay. Se aisló en Argentina a partir de equinos en los años '30. Sucedieron varias epizootias a intervalos de tiempo variable y sólo se registraron casos humanos en Argentina en la provincia de Río Negro 1982-1983. En Uruguay se detectó un caso fatal en 2009, sin epizootias asociadas.

El EEOV se mantiene en un ciclo enzoótico entre aves paseriformes como reservorios y su mosquito vector específico, *C. tarsalis*, según lo descrito en América del Norte. Las aves domésticas y silvestres se consideran importantes reservorios y huéspedes amplificadores de epizootias. También se ha sugerido que los lagomorfos y los roedores pueden servir como huéspedes de amplificación cuando los mosquitos *Aedes* los infectan con EEOV. El hombre y los equinos se comportan como huéspedes terminales cuando son picados por el vector infectado.

El 26 noviembre de 2023 el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria de Argentina (SENASA) emitió una Alerta Epidemiológica informando los resultados virológicos positivos para Alphavirus en muestras de equinos con enfermedad neurológica de las provincias de Corrientes y Santa Fe y sospecha de casos en Entre Ríos, Córdoba y Buenos Aires. El 27 de noviembre, los laboratorios del Instituto Dr. J. M. Vanella y del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Castelar confirmaron la detección del EEOV y el Centro de Referencia del Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas "Dr. Julio I. Maiztegui" (INEVH)-ANLIS corroboró el diagnóstico. Como consecuencia, el Ministerio de Salud de Argentina emitió una alerta para reforzar la vigilancia clínico-epidemiológica, así como las medidas de prevención y control de la infección humana por EEOV.

Los flavivirus (familia Flaviviridae) son virus envueltos transmitidos por artrópodos hematófagos y los de mayor impacto a nivel de salud pública son el dengue, zika y la fiebre amarilla (virus prototipo de la familia y a quien debe el nombre).

Los flavivirus que más se asocian a síndromes neurológicos en el hombre son el virus de la encefalitis de San Luis (SLEV) y el virus del Nilo Occidental (WNV). Por el ciclo de transmisión que presentan estos virus, donde el hombre es un huésped terminal (y no amplificador), el diagnóstico recae fundamentalmente en la serología: detección de anticuerpos IgM en suero y LCR y de anticuerpos IgG en muestras pareadas a través de la técnica de neutralización en cultivos celulares (PRNT90) frente a panel de flavivirus con evidencias de circulación en la región: los 4 serotipos de virus dengue, SLEV, WNV, de la Fiebre amarilla y virus zika. En la Red Nacional de Laboratorios para diagnóstico de Dengue y otros Arbovirus hay 17 laboratorios con capacidad serológica para realizar MAC Elisa IgM "in house" para distintos arbovirus y 26 laboratorios con capacidad molecular para diagnóstico de arbovirus (número que se encuentra continuamente en aumento)

En el año 2013 se realizó la primera detección de genoma viral del SLEV a partir de una muestra de biopsia de cerebro de un paciente pediátrico procedente de San Isidro (Bs As). En 2015 en Pergamino se pudo detectar genoma viral a partir de un paciente, contacto familiar de una persona fallecida con diagnóstico confirmado de SLEV por la técnica de referencia (PRNT90). Este contacto presentó síntomas leves y la toma de la muestra logró hacerse en el período de viremia, antes del inicio de los síntomas leves declarados. La vigilancia sostenida de este agente, permitió detectar en los últimos años, y a través de la vigilancia laboratorial del virus dengue, casos confirmados del SLEV principalmente en la zona central del país: Entre Ríos, Buenos Aires, Santa Fé, Córdoba, Santiago del Estero, reportándose también casos de fallecidos. Los casos confirmados por laboratorio presentaron seroconversión en el título de anticuerpos por técnica de PRNT90 en el par serológico y/o anticuerpos IgM por la técnica MAC Elisa de captura "in house" en la muestra de LCR. Las muestras de sueros y LCR de los casos confirmados se estudiaron por técnica de elisa IgM para varios flavivirus, mostrando mayor densidad óptica (DO) y relación P/N para el virus de la SLEV, que fue el diagnóstico confirmatorio, en comparación a los otros agentes de la familia viral: dengue, WNV, zika y fiebre amarilla.

El WNV se aisló en Argentina en el Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas (INEVH) "Dr Julio I. Maiztegui, a partir del cerebro de 3 equinos (2 de San Antonio de Areco y 1 de Entre Ríos). Desde ese momento se intensificó la vigilancia laboratorial en humanos. Se realizó un análisis de las muestras estudiadas para este agente en el período 2006-2014 donde se detectaron 22 casos de 5700 muestras estudiadas, distribuidos en la región central templada del país fundamentalmente. El último caso detectado, aunque su clasificación fue caso probable al no evidenciar seroconversión en el par serológico por PRNT 90, pero sí presencia de anticuerpos para este agente, fue en la provincia de Bs As (ciudad de San Nicolás) en el año 2016. Al igual que el SLEV, el hombre no genera suficiente viremia para comportarse como huésped amplificador y esto se traduce en la utilización de metodologías serológicas para el diagnóstico de este agente.

En conclusión: en los últimos años tenemos un incremento en Argentina de la actividad de Arbovirus y un mayor reto a la vigilancia laboratorial; el diagnóstico de los Arbovirus requiere un abordaje integrado: laboratorio, clínica, epidemiología y estudios ecológicos de vectores y reservorios, a fin de establecer las correctas acciones de control y prevención; en nuestra experiencia el diagnóstico de las encefalitis por Flavivirus es fundamentalmente serológico y en las infecciones de tipo secundario existen limitaciones por la existencia de amplia reactividad cruzada.

El INEVH es Centro Colaborador OPS/OMS en Fiebres Hemorrágicas Virales y Arbovirus y miembro de RELDA (Red de Laboratorios de Diagnóstico de Arbovirus).

Las arbovirosis son infecciones causadas por un grupo de virus que se transmiten a los humanos principalmente a través de la picadura de mosquitos, constituyendo un grave problema de salud pública a nivel mundial. Estas infecciones son especialmente prevalentes en regiones tropicales y subtropicales, donde las condiciones climáticas favorecen la proliferación de los vectores, generando brotes de gran magnitud que impactan significativamente la salud pública. La mayoría de los arbovirus son endémicos, y debido a su transmisión por vectores, su vigilancia y prevención requieren un monitoreo constante de estos, lo que complica su control y hace casi imposible evitar su expansión a otros países tropicales o subtropicales, e incluso a algunas regiones templadas.

En las Américas, circulan al menos diez arbovirus, entre los que destacan el dengue (DENV), Zika (ZIKV) y chikungunya (CHIKV). Otros arbovirus han sido identificados en áreas geográficas más restringidas, como el virus de la fiebre amarilla (YFV), el virus del Nilo occidental (WNV), el virus de la encefalitis de San Luis (SLEV), y los virus de las encefalitis equinas del Este (EEEV), del Oeste (WEEV) y venezolana (VEEV). Además, los virus Oropouche (OROV) y virus Mayaro (MAYV) han causado brotes en algunos países de la región, con un gran potencial de expansión a otras áreas.

Aunque todos estos virus tienen importancia epidemiológica, el dengue representa la mayoría de los casos notificados, con epidemias que ocurren cada tres a cinco años. Tanto el dengue como el chikungunya son endémicos en la mayoría de los países de América Central, América del Sur y el Caribe; sin embargo, durante la temporada de verano se ha observado un aumento de la transmisión y la expansión de casos más allá de las áreas históricas de transmisión. El año 2023 comenzó con una fuerte transmisión del dengue, y en los meses siguientes, hubo un aumento de los índices de transmisión en el hemisferio sur debido a condiciones meteorológicas favorables para la proliferación de mosquitos.

Según los registros de la Organización Panamericana de la Salud, en 2023 se reportaron más de tres millones de nuevas infecciones por dengue y más de 324,000 casos de chikungunya en las Américas. Con 27,000 casos en toda la región en el mismo período, el Zika presenta una baja incidencia, mientras que los casos esporádicos de fiebre amarilla siguen representando un riesgo constante de reemergencia de esta enfermedad potencialmente letal.

Considerando estos eventos, el panorama epidemiológico de las arbovirosis en la región es altamente complejo debido al potencial epidémico de estas enfermedades. Por ello, es fundamental implementar una estrategia integrada de prevención y control que utilice nuevas innovaciones para caracterizar la situación en cada lugar desde una perspectiva social, ambiental, vectorial, epidemiológica, clínica y virológica.

En esta sesión, contamos con valiosos aportes de: 1) Lionel Gresh (OPS), quien analiza los desafíos en el diagnóstico y vigilancia del dengue ante la emergencia de otras arbovirosis en la Región de las Américas; 2) Santa Elizabeth Ceballos Liceaga (Dirección General de Epidemiología, México), quien proporciona un resumen del panorama epidemiológico y el sistema de vigilancia de las arbovirosis en México; 3) Shirley Villalba (Laboratorio Central de Salud Pública, Paraguay), quien detalla la respuesta de la vigilancia por laboratorio ante el brote de chikungunya en Paraguay; y 4) Leticia Franco (OPS), quien aborda la implementación de la vigilancia entomoviológica (RELEVA) para la detección de virus en mosquitos.

DESAFÍOS EN EL DIAGNÓSTICO Y VIGILANCIA DE DENGUE ANTE LA EMERGENCIA DE OTRAS ARBOVIROSIS EN LA REGIÓN DE LA AMÉRICAS

Lionel Gresh / greshlio@paho.org

Leticia Franco

Jairo Méndez-Rico

Unidad de Gestión de Amenazas Infecciosas, Departamento de Emergencias en Salud, Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS), Washington DC, EE. UU.

Los virus transmitidos por artrópodos (arbovirus) infectan a los seres humanos principalmente a través de la picadura de artrópodos hematófagos como los mosquitos, garrapatas y jejenes. Los arbovirus pertenecen a diversas familias y géneros virales, e incluyen flavivirus, alphavirus, orthobunyavirus, phlebovirus y coltivirus. Los arbovirus de mayor circulación en las Américas son los flavivirus dengue (DENV) y Zika (ZIKV) y el alfavirus chikungunya (CHIKV). Estos tres virus son transmitidos por el mosquito *Aedes aegypti* que se encuentra ampliamente distribuido en el continente americano. Otros arbovirus se han detectado en zonas geográficas más restringidas, como los de la fiebre amarilla (YFV), del Nilo occidental (WNV), de la encefalitis de San Luis (SLEV) y de las encefalitis equinas del Este (EEEV), del Oeste (WEEV) y venezolana (VEEV). Los virus Oropouche (OROV) y el virus Mayaro (MAYV) también han causado brotes en un número limitado de países de la Región y se considera que tienen el potencial de expandirse aún más (1).

A pesar de la circulación de múltiples arbovirus endémicos y emergentes, el DENV continúa siendo el arbovirus de mayor impacto en salud pública en las Américas. La infección por cualquiera de los cuatro serotipos del virus dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) afecta a personas de todas las edades y puede ser asintomática o resultar en un espectro de manifestaciones clínicas que se clasifican en dengue sin signos de alarma, dengue con signos de alarma y dengue grave. Los factores que influyen en este espectro son múltiples e interactúan de forma compleja; sin embargo, el principal factor de riesgo para dengue grave es la infección secundaria por un serotipo distinto al de la infección primaria. Las recomendaciones para el manejo clínico de los casos sospechosos de dengue con el objetivo principal de evitar la progresión a formas severas están bien establecidas y permiten disminuir de manera significativa la mortalidad por dengue (2). No obstante, a la fecha, no contamos con tratamiento antiviral específico y el desempeño de las vacunas disponibles todavía está bajo investigación.

La incidencia del dengue a nivel mundial y en las Américas se ha incrementado considerablemente a lo largo de las últimas décadas. Así, el 2023 fue el año de mayor registro de casos de dengue en las Américas, con un total de 4 565 911 casos, incluyendo 7 653 (0,17%) casos graves y 2 340 fallecidos (tasa de letalidad de 0,051%) y sobrepasando

el máximo de 3 038 137 casos anuales registrados en el 2019. Este aumento se observa en todas las subregiones de las Américas y todas reportaron en 2023 un incremento de casos en comparación con el año anterior. Además, se ha observado un aumento de la co-circulación de múltiples serotipos del virus, incluyendo el número de países y territorios donde se registra co-circulación de los cuatro serotipos.

En este contexto, los sistemas de vigilancia y de laboratorio se enfrentan a varios desafíos. El aumento de los casos sospechosos de dengue incluyendo la co-circulación de varios serotipos del DENV y la co-circulación de múltiples arbovirus que pueden presentar manifestaciones clínicas similares (en particular en los primeros días tras el inicio de los síntomas) implica la necesidad de vigilar estos patógenos de forma simultánea y en áreas geográficas cada vez más extensas. Para los laboratorios, la capacidad de procesamiento se puede ver sobrepasada, en particular en situaciones de brote (por arbovirus u otros agentes infecciosos), y la toma de decisiones en cuanto al uso racional de los recursos de laboratorio implica balancear múltiples variables considerando siempre los objetivos de la vigilancia de laboratorio para estas enfermedades. También existen limitaciones propias de las técnicas que se pueden usar para la detección de las infecciones por DENV. Las técnicas serológicas para DENV pueden presentar reactividad cruzada con infecciones por otros flavivirus (p.ej., ZIKV y YFV), en particular en las infecciones secundarias que generan una respuesta inmune más amplia. Esta reactividad cruzada limita la especificidad de las técnicas serológicas. Además, la detección de anticuerpos IgM en una muestra única no se considera confirmatoria por la presencia prolongada de estos anticuerpos por semanas o incluso meses. Estas limitaciones no significan que las técnicas serológicas no sean útiles para la vigilancia del dengue, pero hacen indispensable el análisis cuidadoso de los datos provenientes de estas técnicas. Finalmente, a la fecha, no se cuenta con pruebas rápidas de antígeno (inmunocromatográficas) que tengan desempeño suficiente para ser usadas como herramientas en la vigilancia del dengue y otros arbovirus. Por estas razones, la implementación de las técnicas moleculares (detección del ARN viral por RT-PCR) juega, hoy en día, un papel fundamental en la vigilancia laboratorial del dengue (3).

Para enfrentar estos desafíos, la OPS y sus Estados Miembros han trabajado de conjunto en la implementación de un paquete de actividades que permita garantizar la estandarización de los procesos preanalíticos, analíticos y post-analíticos, en el marco de sistemas de gestión de la calidad fortalecidos. Esto incluye capacitaciones a nivel regional, subregional y nacional, así como el desarrollo y la socialización de procedimientos estándares y de algoritmos de laboratorio

Las recomendaciones establecidas en este marco resalta que las pruebas de laboratorio de dengue se usan con fines de vigilancia y no para la toma de decisiones clínicas en el tratamiento de los pacientes. Los protocolos de manejo clínico, incluyendo la pronta identificación de los signos de alarma deben implementarse en todo caso que cumpla con la definición de caso sospechoso de dengue sin necesidad de esperar un resultado de laboratorio. Para la vigilancia del dengue, se debe mantener la detección y caracterización oportuna de los casos sospechosos. Se recomienda la toma de muestra y procesamiento en todos los casos de dengue grave (incluyendo los fallecidos) y de dengue con signos de alarma, mientras que sólo un subconjunto de aquellos casos sin signos de alarma es necesario para la vigilancia. Según las capacidades de cada sistema de laboratorio, se recomienda tomar y procesar muestras de entre 10 y 30 % de los casos sin signos de alarma o de un número limitado de muestras por semana epidemiológica. Cual sea la estrategia de selección de los casos y muestras, se recomienda asegurar la representatividad de estos, tomando en cuenta sexo, edad y localidad geográfica.

Finalmente, los resultados de laboratorio deben ser siempre analizados en conjunto con la información demográfica, clínica y según contexto epidemiológico (4).

La detección en el laboratorio de las infecciones por DENV está basada en pruebas virológicas (detección de ARN por RT-PCR, detección de antígeno NS1 por ELISA, aislamiento viral) y pruebas serológicas (detección de anticuerpos IgM y/o IgG). En general, los ensayos virológicos se realizan en muestras de suero tomadas durante los primeros 5 días después de iniciados los síntomas (fase aguda), mientras que los serológicos se realizan a partir del 6º día, también en muestras de suero. La RT-PCR es altamente sensible y, dependiendo de la viremia, puede detectar el ARN viral por hasta 7 días. En la fase aguda, se puede también detectar el antígeno viral NS1 por ELISA con buena sensibilidad y especificidad. El aislamiento de los virus se lleva a cabo en cultivo celular o por inoculación de ratones lactantes (u otros roedores). Sin embargo, por su complejidad y costo, el aislamiento viral no se usa para el diagnóstico de rutina (4).

Por otro lado, los ensayos serológicos que detectan anticuerpos de tipo IgM (como el ELISA), deben ser analizados con cautela teniendo en cuenta las limitaciones antes mencionadas de persistencia de los anticuerpos y de reactividad cruzada. La toma de muestras pareadas (en fase aguda y convaleciente) permite identificar casos con seroconversión de anticuerpos IgM o de aumento significativo de títulos de anticuerpos IgG o totales en ensayos de ELISA cuantitativos (u otros como la inhibición de la hemaglutinación o los ensayos de neutralización). Sin embargo, la toma de muestras pareadas en el contexto de la vigilancia rutinaria es compleja desde un punto de vista logístico. La realización de pruebas serológicas diferenciales (para detectar otros flavivirus) permite identificar casos que no presentan reactividad cruzada y se pueden atribuir específicamente a una infección reciente por DENV. En los casos de reactividad cruzada por ELISA, las técnicas de neutralización (p.ej., PRNT o microneutralización), consideradas el estándar de oro en la detección serológicas de las infecciones por arbovirus, pueden ser de utilidad para detectar el virus infectante pero no están exentas de reactividad cruzada, son complejas de implementar y se recomienda su uso en muestras pareadas (4).

Para las técnicas descritas anteriormente, el tipo de muestra que se utiliza rutinariamente es el suero. Sin embargo, en casos con sospecha de enfermedad neurológica (por ej., encefalitis u otras encefalopatías) con sospecha de dengue, se recomienda la detección del ARN viral y de anticuerpos de tipo IgM en líquido cefalorraquídeo (LCR) tomado por indicación clínica y no con el solo propósito de identificar el agente etiológico. En fallecidos con sospecha de dengue también se recomienda la toma de muestras de tejido (hígado, riñón, pulmón, ganglio linfático, timo, médula ósea y cerebro) para la detección del ARN viral como la detección de los antígenos virales por inmunohistoquímica y también para la caracterización histopatológica de los tejidos (4).

Para varias enfermedades (p.ej., malaria, COVID-19), la expansión de la capacidad de testeo en condiciones de brote se ha visto facilitada por la introducción y el uso de pruebas de diagnóstico rápido, en particular, las pruebas inmunocromatográficas. En el caso del dengue, estas pruebas rápidas no se recomiendan. Las pruebas rápidas que detectan el antígeno viral NS1 presentan una baja sensibilidad y por lo tanto, un riesgo importante de falsos negativos. Si bien la especificidad de estas pruebas es relativamente alta, no alcanza la de las técnicas moleculares, y en periodos de baja circulación de DENV, su valor predictivo positivo puede verse afectado. La detección de anticuerpos por pruebas rápidas no es confirmatoria y está sujeta a las mismas consideraciones expuestas previamente. En casos donde se considere la implementación de estas pruebas por no estar disponibles las plataformas de ELISA o moleculares, es importante considerar, además de las limitaciones

ya expuestas, que las pruebas deben contar con una validación externa o una evaluación del desempeño diferente a la que ofrece el fabricante (4).

Frente a los desafíos que representa la circulación intensa del dengue sumada a la emergencia de otros arbovirus, una de las estrategias que ha adoptado la Región de las Américas ha sido el trabajo en redes. En el 2008, se estableció la RELDA como Red de Laboratorios de Dengue de las Américas. Su objetivo principal era fortalecer las capacidades científicas y técnicas, así como establecer protocolos de laboratorio estandarizados para el diagnóstico del dengue. Con la introducción y la expansión de otros arbovirus, en particular CHIKV y ZIKV, esta red se convirtió, en el 2016, en la Red de Laboratorios de Diagnóstico de Arbovirus de las Américas, manteniendo la sigla RELDA. La red, que en la actualidad agrupa 40 laboratorios nacionales de referencia de 36 países y territorios, juega un papel fundamental en el intercambio de conocimiento e información y en la estandarización de los procesos de vigilancia de laboratorio. Los cinco Centros Colaboradores de la OPS/OMS (INEVH-Argentina, IEC-Brasil, IPK-Cuba, InDRE-México, CDC Arboviral Diseases Branch-USA) y los dos asesores técnicos (CDC Dengue Branch-Puerto Rico y CARPHA) impulsan también el fortalecimiento de las capacidades nacionales, la respuesta a brotes y epidemias, y la definición de recomendaciones regionales. El trabajo de la red se ha ampliado a nuevas áreas de trabajo incluyendo la vigilancia entomo-virológica y la vigilancia genómica. Con este fin, se establecieron la Red de Laboratorios de Entomo-Virología de las Américas (RELEVA) y la Red de Vigilancia Genómica de Arbovirus (ViGendA) las cuales definen e implementan sus actividades en el marco general de RELDA (ver las presentaciones de Leticia Franco en las sesiones de Arbovirus Endémicos y Vigilancia Genómica, respectivamente). Además, RELDA ha mantenido una colaboración estrecha con otras redes panamericanas, iberoamericanas y globales, incluyendo COVIREN y SARI*net* plus (Red de Infecciones Respiratorias Agudas Severas de las Américas) y ViGendA también forma parte de las Redes de Vigilancia Genómica Regional de la OPS (PAHOGen). Este trabajo transversal, a todos los niveles - patógenos, áreas técnicas, países y regiones - permite maximizar impacto y minimizar costos para garantizar que los países de las Américas establezcan y mantengan las capacidades esenciales de los sistemas de vigilancia y de laboratorio tal como lo requiere el Reglamento Sanitario Internacional.

En conclusión, es importante resaltar que, si bien existen numerosos desafíos tanto técnicos como epidemiológicos en el diagnóstico y la vigilancia del dengue en las Américas, la región cuenta con sistemas de vigilancia y de laboratorio establecidos que permiten dar respuesta a estos desafíos. Estos sistemas se deben seguir fortaleciendo con un trabajo a nivel nacional pero también a través de redes regionales e internacionales y con el apoyo continuo de la OPS/OMS. Este trabajo incluye la expansión de la RELDA en el Caribe Oriental y el apoyo a la descentralización a nivel subnacional cuando sea posible y necesario. En este quehacer siempre se debe recordar que, para el dengue y la mayoría de las arbovirosis, los resultados de laboratorio son para fines de vigilancia y no para el manejo de casos individuales. Además, nuestros países deben prepararse para la detección temprana y caracterización de arbovirus emergentes, reemergentes y de arbovirus neurotrópicos, y los sistemas de laboratorio son fundamentales en esta tarea. Finalmente, la mejor integración de la vigilancia de laboratorio y epidemiológica es una tarea continua, así como la incorporación, analizando cuidadosamente costos y beneficios, de herramientas que aportan información adicional como la vigilancia genómica y entomo-virológica.

Bibliografía

1. Organización Panamericana de la Salud. Recomendaciones para la detección y el diagnóstico por laboratorio de infecciones por arbovirus en la Región de las Américas. Washington, D.C.; 2022. Disponible en: <https://doi.org/10.37774/9789275325872>
2. Organización Panamericana de la Salud. Dengue: guías para la atención de enfermos en la Región de las Américas. 2ª ed. Washington, D.C.; 2016. Disponible en: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/28232>
3. Organización Panamericana de la Salud. Alerta Epidemiológica - Aumento de casos de dengue en la Región de las Américas - 16 de febrero del 2024. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/alerta-epidemiologica-aumento-casos-dengue-region-americas-16-febrero-2024>
4. Organización Panamericana de la Salud. Nota técnica: Algoritmo para la confirmación por laboratorio de casos de dengue. 1º de diciembre de 2023. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/nota-tecnica-algoritmo-para-confirmacion-por-laboratorio-casos-dengue>

PANORAMA EPIDEMIOLÓGICO Y SISTEMA DE VIGILANCIA DE LAS ARBOVIROSIS EN MÉXICO

Santa Elizabeth Ceballos Liceaga / elizabeth.ceballos@salud.gob.mx

Directora de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Transmisibles, Dirección General de Epidemiología, México

Guillermo Carbajal Sandoval

Marco Antonio Padilla Monroy

Irma López Martínez

Lucia Hernández Rivas

Mauricio Vázquez Pichardo

Gabriel García Rodríguez

Dirección General de Epidemiología, México

Ruy López Ridaura

Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud

A la semana epidemiológica 46 del 2023, se tienen registrados un total de 45, 982 casos confirmados de dengue de los cuales 24,793 son dengues no graves, 19,846 dengues con signos de alarma y 1343 dengues graves de los cuales el 66% de los casos confirmados se concentran en 5 estados: Yucatán, Veracruz, Quintana Roo, Morelos y Puebla, con un aumento de casos confirmados del 4.1 por ciento mayor a comparación con el año anterior a la misma semana y una letalidad en el 2022 con 0.63 y en el 2023 0.62.

Situación Actual de Dengue; México. En la curva epidémica de casos de Dengue en México para los años 2022 – 2023, se muestra un aumento de casos probables y confirmados superior a lo reportado al año anterior, a partir de la semana epidemiológica 1 con un aumento de mayor número de casos en la semana epidemiológica 20, alcanzando su pico máximo en las semanas 37 y 38, posterior a un descenso de casos de acuerdo a la temporalidad de la enfermedad.

Casos de Dengue por Entidad Federativa; México, 2022 – 2023. Se evidencia el aumento de casos probables, confirmados por clasificación y el número de defunciones considerando que a la misma semana eran de 29 defunciones y en el 2023 de 132, siendo los estados con mayor número de defunciones: Morelos (27), Veracruz (26) y Quintana Roo (20), donde se concentran el 55 % de las defunciones a nivel nacional.

Incidencia y Serotipos Identificados por RT-PCR de Dengue, por Entidad Federativa; México, 2023. El estado que presenta la incidencia más alta de casos confirmados es Yucatán (424.33), y quince estados de la república presentan la circulación de los 4 serotipos de dengue; identificándose que el serotipo con mayor circulación en el país es el dengue virus 3 el cual concentra 58% de los serotipos identificados. Desde el año 2006 no se había identificado un mayor número de casos de dengue con el serotipo 3 hasta el 2023,

siendo este serotipo quien registra el mayor número de casos graves en comparación a años anteriores con predominio de serotipos 1 y 2.

Casos e Incidencia de Fiebre Chikungunya según Entidad Federativa; México, 2023. A la semana epidemiológica 46 del 2023, se tienen registrados dos casos confirmados en los estados de Baja California Sur (1) con una incidencia del 0.12 y Chiapas (1) con una incidencia 0.01, por cada 100 mil habitantes, sin identificarse casos autóctonos.

Distribución de casos de Fiebre Chikungunya, México 2014-2023. Desde la introducción del virus en el país en junio 2014 al 13 de noviembre de 2023 se tienen registrados un total de 13,698 casos autóctonos confirmados y 38 casos importados de fiebre Chikungunya. Del 01 de enero al 13 de noviembre de 2023 se tienen registrados dos casos confirmados y 158 casos probables en 2023, 158 casos reportados en el sitio restringido por Centro Nacional de Enlace (CNE). El año con mayor número de casos confirmados registrados en el país fue el 2015 con 12,588 casos confirmados, seguido por 2016 con 759, actualmente se tiene la vigilancia de casos probables por chikungunya además de los casos probables por dengue que se realiza mediante la utilización de la metodología RT-qPCR TRIPLEX.

Curva epidémica de Casos autóctonos de Fiebre Chikungunya; México, 2014-2023. Los casos probables por año entre el 2014 al 2023 con mayor número de registros en el año 2015 con 115,448 casos probables, con 12,588 casos confirmados, el segundo año con mayor registro de casos fue el 2016 con 21,078 casos probables notificados y 759 casos confirmados, en los últimos 5 años se ha tenido un descenso de los casos notificados y confirmados de los cuales suman 26 casos confirmados: 2019 (4), 2020 (7), 2021 (4), 2022 (4), y 2023 (2).

Casos de Enfermedad por virus del Zika; México, 2023. A la semana epidemiológica 46 del 2023, se tienen 27 casos autóctonos confirmados en dos estados, distribuidos de la siguiente manera: 26 en el estado de Morelos con una incidencia del 1.23 y Quintana Roo (1) con una incidencia del 0.05. por cada 100 mil habitantes. Desde la introducción del virus en la república mexicana en el año 2015 hasta el año actual se tiene un total de 13,030 casos confirmados, siendo el año 2016 donde se registró el mayor número de casos confirmados con 8,554 casos representando el 66% desde su introducción. Los estados con mayor incidencia acumulada son Yucatán (56.81), Nayarit (52.90) y Colima con (36.19) por 100 mil habitantes.

Curva Epidémica de Casos Autóctonos de Enfermedad por virus del Zika; México, 2015-2023. En los años donde se presentaron el mayor número de casos confirmados son 2016 (8,554), 2017 (3,344) y 2018 (877). Al igual que en chikungunya la vigilancia por RT-qPCR TRIPLEX por dengue en el país mantiene la vigilancia activa de esta enfermedad.

Mujeres embarazadas con diagnóstico de Enfermedad por virus del Zika. Desde el 2025 hasta la semana epidemiológica 45 del 2023 se tiene un registro de 7,156 mujeres embarazadas con diagnóstico confirmatorio a Enfermedad por Virus del Zika, siendo los estados con mayor número de casos Yucatán (926), Veracruz (888), Tamaulipas (692), Nuevo León (679) y Chiapas con (562), los cuales representan el 52% de los casos a nivel nacional.

Casos Confirmados de Arbovirosis por Semana, México, 2014-2023. Los años con mayor número de casos de dengue, enfermedad por virus Zika y fiebre Chikungunya. Siendo para dengue los años con mayor número de casos confirmados 2019 con un 33 % de dengues graves siendo el dengue virus 2 el serotipo que predominó y el 2023 del dengue virus 3 con un 47% de formas graves. El 2015 el año con mayor número de casos de fiebre chikungunya y el 2016 el año con mayor número de casos confirmados para enfermedad por virus zika.

Otras Arbovirosis de Vigilancia Epidemiológica, México, 2003-2023. Para fiebre del Nilo occidental en México del 2003 al 2023 a la semana 46, se tienen 10 casos confirmados de la siguiente manera, 2003 (6), 2004 (1), 2006 (1), 2021 (1) y 2022 (1). En los Sistemas de Vigilancia Epidemiológica de Fiebre Amarilla, Fiebre de Mayaro y Encefalitis Equina Venezolana no se han reportado casos confirmados.

Mecanismo de Vigilancia epidemiológica de las Arbovirosis. El Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), es el conjunto de estrategias y acciones epidemiológicas que permiten la producción de información epidemiológica útil para la salud pública la cual genera información en tiempo real, junto con los resultados que otorga la Red Nacional de Laboratorios (RNL) del INDRE, para que las estrategias de prevención y control realizadas por el CENAPRECE, identifiquen y contengan los brotes de manera oportuna.

Se tienen metodologías y procedimientos específicos para cada tipo de padecimiento en apego a nuestra normativa: NOM-017-SSA2-2012 y el Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Vector (ETV). Donde se especifica, las acciones en vigilancia epidemiológica por cada nivel técnico administrativo desde nivel local, estatal y federal.

En el caso de las Arbovirosis, la metodología para su vigilancia incluye: Vigilancia convencional, elaboración de estudio epidemiológico que en el caso de México es un único estudio para todas las ETV, estudios de brote, registro nominal en la plataforma electrónica de las ETV, sistema especial de vigilancia epidemiológica, vigilancia basada en laboratorio, el cual se lleva en la misma plataforma en tiempo real y vigilancia de la mortalidad, además del aval de las defunciones con expertos clínicos en las patologías como dengue, fiebre amarilla, (actualmente no existen casos autóctonos en el país) enfermedad por virus zika y enfermedad por virus chikungunya, en los comités de vigilancia epidemiológicas desde nivel jurisdiccional (COJUVE), estatal (CEVE) y federal (CONAVE).

La vigilancia epidemiológica, es llevada a cabo en la búsqueda de casos probables desde su detección, notificación, registro y seguimientos de los casos en las plataformas. La detección de los casos se lleva a cabo de acuerdo al cumplimiento de las definiciones operacionales de caso, en todo el sistema nacional de salud, y se caracteriza por tener una gran sensibilidad.

Definiciones Operacionales. La definición operacional para dengue se divide en la siguiente clasificación de acuerdo a los signos y síntomas y gravedad del paciente.

Caso Probable de Dengue No Grave (DNG): Toda persona de cualquier edad que resida o que proceda, en los 14 días previos al inicio de signos y síntomas, de una región donde exista transmisión de la enfermedad y que presente fiebre y signos y síntomas de 2 o más de los siguientes grupos:

- Grupo 1: Náusea y/o vómitos
- Grupo 2: Exantema
- Grupo 3: Mialgias y/o artralgias
- Grupo 4: Cefalea y/o dolor retro-ocular
- Grupo 5: Petequias y/o prueba del torniquete positiva
- Grupo 6: Leucopenia
-

Caso Probable de Dengue Con Signos de Alarma (DCSA): Todo caso probable que además de cumplir con cuadro de DNG presente uno o más de los siguientes signos de alarma:

- Dolor abdominal intenso y continuo.
- Vómito persistente o incoercible.
- Acumulación de líquidos (ascitis, derrame pleural, pericárdico).
- Sangrado de mucosas (epistaxis, gingivorragia).
- Letargo o irritabilidad.
- Hipotensión postural.
- Hepatomegalia mayor de 2 cm.
- Aumento progresivo del hematocrito.
- Recuento plaquetario menor a 100,000 plaquetas por microlitro o disminución progresiva de plaquetas.
- Disminución progresiva de la hemoglobina
-

Caso Probable de Dengue Grave (DG): Todo caso probable de Dengue que presenta uno o más de los siguientes hallazgos:

- Choque debido a extravasación grave de plasma evidenciado por: taquicardia, extremidades frías y llenado capilar igual o mayor a tres segundos, pulso débil o indetectable, presión diferencial convergente ≤ 20 mm hipotensión arterial en fase tardía, acumulación de líquidos que conlleve a insuficiencia respiratoria.
- Sangrado grave, según la evaluación del médico tratante (ejemplos: hematemesis, melena, metrorragia voluminosa, sangrado del sistema nervioso central)
- Compromiso grave de órganos tales como: daño hepático importante (AST o ALT > 1000), afección renal, sistema nervioso central (alteración de la conciencia), corazón (miocarditis) u otros órganos.
-

Caso Probable de Fiebre Chikungunya: Toda persona que presente cuadro febril agudo más la presencia de poliartalgias severas (incapacitantes) o artritis de comienzo agudo y que se identifique asociación epidemiológica como puede ser:

- Presencia del vector *Aedes aegypti* o *Aedes albopictus*.
- Antecedente de visita o residencia en áreas de transmisión en las dos semanas previas al inicio del cuadro clínico.
- Existencia de casos confirmados en la localidad.

Nota: En menores de 5 años, el único signo a considerar puede ser la fiebre

Caso Probable de Enfermedad por Virus Zika: Paciente que presente exantema* y al menos dos o más de los siguientes signos o síntomas: Fiebre, cefalea, conjuntivitis (no purulenta/hiperemia), artralgias, mialgias, edema periarticular, prurito, dolor retroocular y que se identifique alguna asociación epidemiológica:

- Presencia del vector *Aedes aegypti* o *Aedes albopictus*,
- Antecedente de visita o residencia en áreas de transmisión en las dos semanas previas al inicio del cuadro clínico, o
- Existencia de casos confirmados en la localidad,
- Tenga antecedente de contacto sexual sin protección en las 2 semanas previas a la aparición de los síntomas, con una persona que en las 8 semanas previas al contacto sexual tenga antecedente de residencia o viaje a un área con transmisión local del VZIK o con presencia de vectores.

Nota: En menores de 5 años, el único signo a considerar puede ser la fiebre.

La vigilancia epidemiológica de estas tres enfermedades, al ser el mismo vector de transmisión también se lleva a cabo por laboratorio al realizarse a las muestras que se toman a los primeros 5 días de la fiebre, la técnica RT-qPCR TRIPLEX, el cual nos da el resultado para dengue, enfermedad por virus zika y fiebre chikungunya.

Caso Probable de Fiebre de Mayaro: Toda persona que presenta un cuadro clínico de fiebre y presencia de poliartalgias más uno o más de los siguientes signos y síntomas: Exantema, cefalea, mialgias, conjuntivitis o edema articular y que se identifique alguna asociación epidemiológica como:

- Antecedente de visita o residencia en áreas de transmisión en las dos semanas previas al inicio del cuadro clínico.
- Antecedente de existencia de casos confirmados en la localidad.
- Antecedente de existencia de diagnósticos confirmados en animales de la localidad.

Caso Probable de Fiebre del Nilo Occidental forma No Neurológica: Toda persona que presente cuadro clínico caracterizado por fiebre y se acompañe de dos o más de los siguientes: cefalea, artralgias, mialgias, astenia, adinamia, náuseas, vómito, exantema y/o adenomegalias, y que se identifique alguna asociación epidemiológica:

- Presencia de vectores.
- Antecedente de visita o residencia en áreas de transmisión en las dos semanas previas al inicio del cuadro clínico;
- Antecedente de existencia de casos confirmados en la localidad;
- Antecedente de existencia de diagnósticos confirmados en animales de la localidad.

Caso Probable de Fiebre del Nilo Occidental forma Neurológica: Toda persona que presenta un cuadro clínico de fiebre y manifestaciones neurológicas (meningitis o encefalitis), con resultados de LCR compatibles con infección viral y que se identifique alguna asociación epidemiológica.

Proceso de Notificación. Es la detección y el llenado del “Estudio Epidemiológico de Enfermedades Transmitidas por Vector” para su posterior registro en la Plataforma Única de Información del SINAVE de todo caso probable de acuerdo a las definiciones operacionales; se debe realizar por el médico tratante.

Periodicidad de la notificación de las Arbovirosis. De acuerdo a los sistemas especiales, la notificación de las enfermedades como fiebre del Nilo Occidental, fiebre amarilla y dengue en su clasificación de dengue con signos de alarma y dengue grave se debe de realizar de manera inmediata, dengue no grave enfermedad por virus chikungunya y enfermedad por el virus zika se realiza de manera semanal.

Sistema de Registro. Plataforma Única de Información del SINAVE. Se cuenta con un apartado exclusivo para el registro de las ETV y se coloca el diagnóstico probable de acuerdo a las defunciones operacionales. En el proceso de actualización del sistema de notificación se agruparon los signos y síntomas de acuerdo a las definiciones operacionales de cada enfermedad, para que los médicos tratantes, usen el estudio epidemiológico como guía para poder clasificar las enfermedades de acuerdo a los signos y síntomas que presentan los pacientes y se fortalezca la notificación y la clasificación correcta de las enfermedades transmitidas por vector. Finalmente se contó con el trabajo y la aprobación final de los Grupos Técnicos y las autoridades del CONAVE.

Vigilancia de la mortalidad por Arbovirosis. Se realiza de acuerdo a la detección y notificación de las defunciones en los 32 estados de la república mexicana, que de acuerdo a los manuales se deben de dictaminar a nivel jurisdiccional, nivel estatal y posteriormente avalados por el nivel federal, junto con los expertos clínicos de cada entidad. Para validar si el paciente falleció con dengue o por dengue y especificar la causa básica de la defunción, además de encontrar las áreas de oportunidad evidenciadas en la reunión, para corregirlas y evitar que se sigan repitiendo y así disminuir la letalidad.

* * *

Se especifica que para el presente resumen no se requirieron fuentes de financiamiento y no se cuenta con participación en Redes.

La información contenida en el presente trabajo puede ser consultada en:

Panorama Epidemiológico de Fiebre por Dengue y Fiebre Hemorrágica por Dengue con información del Sistema Especial de Vigilancia Epidemiológica de Dengue. Publicación por Semana Epidemiológica a cargo de la Dirección de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Transmisibles.

<https://www.gob.mx/salud/documentos/panorama-epidemiologico-de-dengue-2023>

Informes Semanales para la Vigilancia Epidemiológica de Dengue 2023. Dirección General de Epidemiología. Informes Semanales con información ya sea del Sistema de Notificación de Casos Semanales o bien de algún Sistema Especial de Vigilancia Epidemiológica, según corresponda. Publicación semanal a cargo de la Dirección de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Transmisibles.

<https://www.gob.mx/salud/documentos/informes-semanales-para-la-vigilancia-epidemiologica-de-dengue-2023>

Casos Confirmados de Infección por Virus Zika 2023. Dirección General de Epidemiología. Publicación a cargo de la Dirección de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Transmisibles.

<https://www.gob.mx/salud/documentos/casos-confirmados-de-infeccion-por-virus-zika-2023>

Casos Confirmados de Fiebre Chikungunya 2023. Dirección General de Epidemiología. Publicación a cargo de la Dirección de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Transmisibles.

<https://www.gob.mx/salud/documentos/casos-confirmados-de-fiebre-chikungunya-2023>

Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Vector (ETV).

https://epidemiologia.salud.gob.mx/gobmx/salud/documentos/manuales/36_Manual_ETV.pdf

RESPUESTA DE LA VIGILANCIA POR LABORATORIO ANTE EL BROTE DE CHIKUNGUNYA EN PARAGUAY

Shirley Desiree Villalba / shirleyvillalba@hotmail.com

Jefe de Departamento de Virología, Laboratorio Central de Salud Pública, Ministerio de Salud, Paraguay

La fiebre Chikungunya es una enfermedad transmitida por mosquitos causada por el virus Chikungunya (CHIKV), un virus de ARN monocatenario de sentido positivo perteneciente a la familia *Togaviridae*, que se transmite a los humanos a través de la picadura de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* infectados.

Las áreas de riesgo para transmisión de la enfermedad están relacionadas a factores climáticos y ambientales, pues esto tiene impacto en el aumento en la proliferación de los mosquitos vectores y en índice de infestación larvaria.

El ingreso de este virus al Paraguay se dio por primera vez en junio de 2014 donde se detectó un caso importado de CHIKV, en una persona procedente de República Dominicana, circulando junto a Dengue durante ese año.

En Paraguay se detectaron infecciones autóctonas en 2015 y desde esa fecha se ha detectado CHIKV en el país en varios años. Según las sospechas de infecciones por CHIKV notificadas, Paraguay ha tenido 4 oleadas epidémicas, en 2015, 2016, 2018 y 2023, todas asociadas principalmente con los meses de verano.

Desde el 2015 se reportan casos de Chikungunya en el país, con un número de personas afectadas por debajo de los 500 casos semanales. En aquel año, el brote acumuló un total de 4.000 casos, concentrados en Central y Asunción.

En el 2016 se observó una cifra similar, un brote pequeño que luego no prosperó. En ese momento, realizó su introducción en el continente americano el virus Zika. En dicho periodo se realizó la caracterización molecular del virus Chikungunya, logrando identificar la circulación del genotipo asiático.

A partir del 2018, se registraron brotes concentrados en Amambay, localidad de Pedro Juan Caballero.

Durante el 2022 y parte del 2023 se ha visto un aumento de precipitaciones en gran parte del territorio sudamericano, esto genera un ambiente propicio para los criaderos de mosquitos.

El LCSP cumple un rol de suma importancia en la vigilancia activa de los patógenos virales, y es así que gracias a este trabajo se logró la detección oportuna de los primeros casos, los cuales tuvieron lugar en la Semana Epidemiológica 14 del 2022, realizando la comunicación de manera inmediata. Sin embargo, la propagación de los casos se dio en todo el país.

En el 2022 se comienzan a detectar nuevamente brotes de Chikungunya en el departamento Central, puntualmente en los distritos de Mariano Roque Alonso y Limpio. Entre octubre y noviembre del mismo año se observó una dispersión del virus en los demás distritos de Central y también en Asunción. El mayor porcentaje de los casos de Chikungunya se localizan en estas regiones del país.

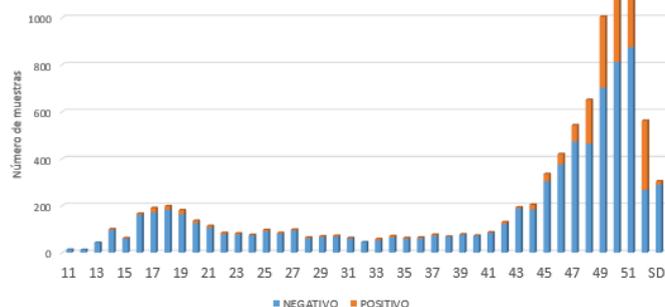


Figura 1. Casos reportados y clasificados para Chikungunya desde la semana epidemiológica 14 del año 2022 en Paraguay.

Se obtuvieron 2023 casos confirmados para Chikungunya desde la semana epidemiológica 14, a partir de muestras que pertenecen a regiones sanitarias diferentes. La mayor parte de los casos se encontraban concentrados en Asunción (Capital) y el Departamento central, estos fenómenos se relacionan a la mayor población en estas zonas del País

Desde el inicio del brote SE40 del 2022 a la SE43 del 2023, se registraron 117.439 casos a nivel país y 26918 sospechas acumuladas, con una tasa de incidencia acumulada de 1.510 casos/100.000 habitantes (Figura 2).

El 74% de los casos fueron de Central, Capital y Alto Paraná. El mayor número de casos se registró entre las SE4 a la SE12 del año 2023 con más de 8000 casos por semana. El fenómeno de los aumentos de casos se vio a finales del 2022, desde la SE40 en adelante, y desde esta semana se decretó el inicio de la epidemia de Chikungunya en el Paraguay, llegando al pico máximo en la SE6/2023.

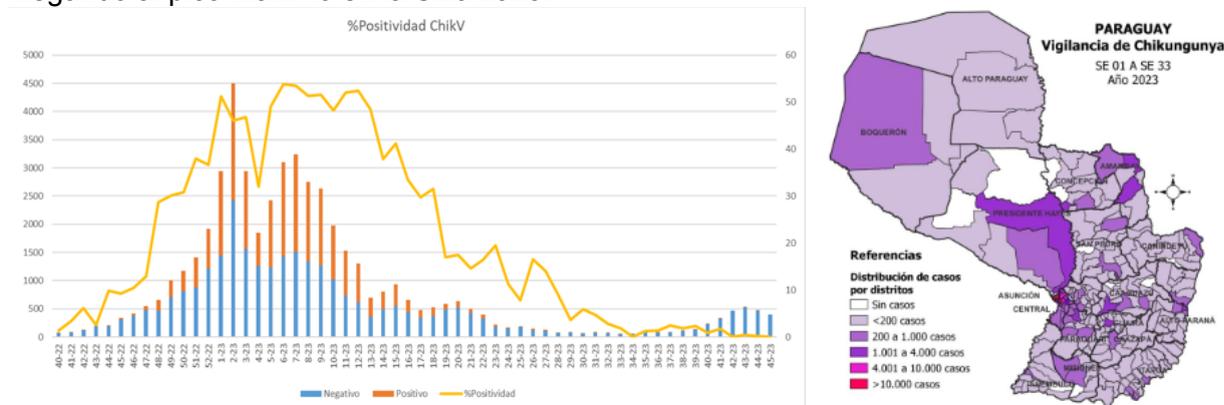


Figura 2. En la parte derecha puede observarse el histograma de los casos reportados y clasificados, así como el % de positividad (línea amarilla) para Chikungunya desde la SE14 del año 2022 y hasta la SE43 del 2023 en Paraguay. En la parte izquierda, puede verse un mapa del país y la tasa de distribución de casos para el año 2023.

Desde la SE1 a la SE45 del año 2023 se registraron 334 defunciones confirmadas y probables de CHIKV (Figura 3).

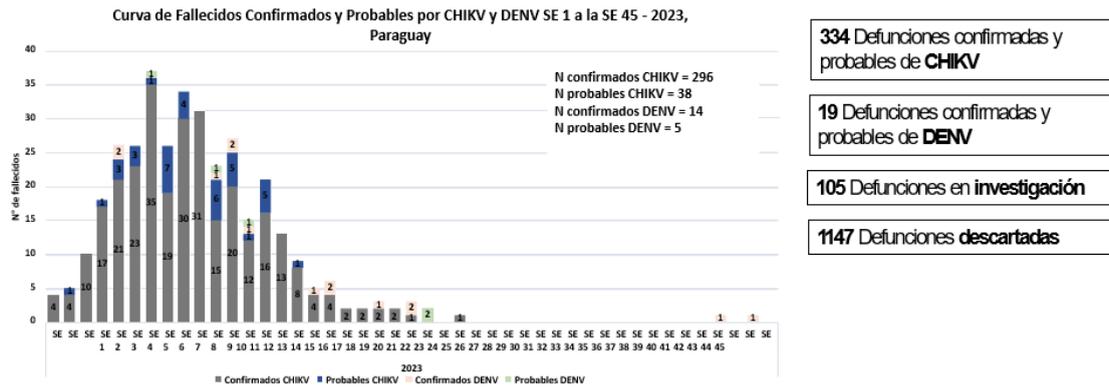


Figura 3. Curva de notificaciones de fallecidos por Dengue y Chikungunya desde la SE1 a la SE45 del año 2023 en Paraguay. El análisis se realiza según semana epidemiológica de fecha de inicio de síntomas. Dirección General de Vigilancia de la Salud.

En cuanto a la tasa de letalidad global es de 0,2. La tasa de mortalidad es de 3,5 (*100.000 habitantes). El 51% de los fallecidos procedían del departamento Central, seguido de Asunción y Alto Paraná y en menor proporción el resto de los departamentos.

Mediante la vigilancia genómica, enfoques filodinámicos y epidemiológicos, se caracterizó la epidemia de CHIKV en Paraguay. Fue la primera vez que se detectó en el país el genotipo ECSA (Este y Centro Sur Africano), que es el que se encuentra circulando actualmente.

La epidemia registrada en los años 2022-2023, probablemente haya tenido tal magnitud debido a que hubo transmisión continua dentro de Paraguay durante un período previo, de una cepa viral que se introdujo en el país a principios de 2022.

Desde el Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social del Paraguay en colaboración con el Laboratorio Central de Salud Pública y la Red Nacional de Laboratorios se instalaron laboratorios de Biología Molecular para la detección de Arbovirus. Actualmente, hay 15 laboratorios de Biología Molecular dependientes de la Red Nacional de Laboratorios que se encuentran operando para la Vigilancia de Arbovirosis, mientras que todas las tipificaciones de DENV se llevan a cabo en el LCSP.

DETECCIÓN DE VIRUS EN MOSQUITOS: IMPLEMENTACIÓN DE LA VIGILANCIA ENTOMOVIROLÓGICA (RELEVA)

Leticia Franco / francolet@paho.org

Oficial Técnico de diagnóstico y suministro de laboratorios, Unidad de manejo de riesgos infecciosos, Programa de emergencias en salud, Organización Panamericana de La Salud, Organización Mundial de la Salud

La vigilancia integrada de mosquitos vectores de enfermedades es fundamental para la implementación de acciones de prevención y control oportunos, eficaces y sostenibles. En el caso de las arbovirosis, que en general presentan transmisión en forma de brotes o epidemias, como por ejemplo de Zika, dengue, chikungunya, esta vigilancia debe incluir la capacidad de detección temprana de circulación viral y de serotipos.

Actualmente, la mayoría de los programas nacionales de control de vectores utilizan indicadores entomológicos basados en los estadios inmaduros del vector (huevos y larvas), y esos indicadores hoy tienen utilidad limitada para predecir brotes y epidemias, esto causado por las actuales elevadas tasas de infestación en las ciudades y condiciones socioeconómicas/ambientales favorables a su manutención y dispersión. De esta manera, es importante que se utilicen nuevas metodologías de vigilancia que, asociadas a las ya existentes, puedan fortalecer y mejorar los sistemas de vigilancia entomológica y alerta temprana, una de esas estrategias es el monitoreo de la circulación viral en mosquitos.

En este sentido en el año 2017 se lanza la Red de Laboratorio de Entomo-Virología de las Américas (RELEVA), cuyo principal objetivo es el implementar protocolos homologados en las Américas para la Vigilancia de Arbovirus en mosquitos vectores. RELEVA ha proporcionado la plataforma de intercambio y capacitación en las metodologías existentes e innovadoras para realizar y mantener esta vigilancia, así como la toma de decisiones que deben ser realizadas ante la detección de la circulación de virus en las poblaciones locales de vectores de Arbovirus.

Desde 2017 se han realizado 3 entrenamientos, siendo el último en junio de 2023, después de la pandemia de COVID-19, que ralentizó no solo la vigilancia epidemiológica de Arbovirus si no también la vigilancia entomológica, causando un retroceso en la implementación de la entomovirología en los programas de control.

Desde su creación han participado activamente más de 12 países en diferentes grados de implementación. Desde la OPS se trabaja en el fortalecimiento de los laboratorios de entomología y control de vectores que junto con los laboratorios de la RELDA (Red de Laboratorios de Diagnóstico de Arbovirus) son los pilares fundamentales para el establecimiento de una vigilancia entomoviroológica que contribuya a la vigilancia epidemiológica integral y así poder brindar una alerta temprana en la aparición de nuevos patógenos o caracterizar la dispersión y establecimiento de ciclos de transmisión viral en nuevos vectores.

El incremento de las infecciones causadas por virus respiratorios es evidente en el mundo en general, y en América Latina en particular. Esta situación y la reciente pandemia COVID-19, debida al coronavirus SARS-CoV-2, han reforzado los llamados de alerta de parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y de sus oficinas regionales Organización Panamericana de la Salud (OPS) para que los países refuercen las medidas de prevención, diagnóstico, tratamiento adecuado y vigilancia de las infecciones respiratorias causadas por virus. En dicho contexto, OMS/OPS periódicamente emiten informes de la situación epidemiológica de la Influenza, SARS-CoV-2, Virus Sincicial Respiratorio (VRS) y otros virus respiratorios que de acuerdo a cada país presentan variaciones en el nivel de infecciones.

Ciertamente, algunas de las medidas tomadas por la pandemia COVID-19 influenciaron en la epidemiología de infecciones respiratorias causadas por virus respiratorios diferentes a SARS-CoV-2 con interesantes resultados para cada uno de los virus analizados; por ejemplo, en un estudio realizado en población infantil en China, la prevalencia de influenza disminuyó, pero la prevalencia de infecciones por VRS aumentó. Por lo tanto, es posible que se requieran medidas preventivas diferentes para cada caso de infección por virus respiratorios.

Por otro lado, en varios países se han reportado casos de infección en humanos causados por A(H5N1) lo que evidencia un riesgo de que la influenza aviar sea más común en humanos.

La creciente preocupación por la emergencia de nuevos virus respiratorios, trajo a colación la necesidad de contar con sistemas diagnósticos que permitan la detección de múltiples virus respiratorios en una sola reacción de PCR. Además, se evidencia la necesidad de contar con herramientas moleculares que puedan ser utilizadas tanto para la vigilancia como para la investigación de cepas mutantes o nuevas variantes de estos virus.

En las sesiones sobre virus respiratorios (I y II), contamos con los trabajos de expertos y expertas de América Latina e Iberoamérica, que en conjunto presentan las estrategias de vigilancia, los logros y los desafíos que se presentan en la post pandemia. A través del intercambio de experiencias entre los países asistentes, se reforzó la importancia de mantener integradas las informaciones generadas por los sistemas de vigilancia epidemiológica tanto en animales como en humanas, lo cual brinda ventajas en la preparación y la correcta respuesta hacia potenciales brotes epidémicos.

En las próximas páginas podrán recorrer los trabajos compartidos por Paula Couto y Juliana Leite de la Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud, Abel Peralta Benítez, Rosaura Idania Gutierrez Vargas y Gisela Barrera Badillodes de la Secretaría de Salud de México, Raquel Guiomar del Instituto de Salud de Portugal, Inmaculada Casas desde el Instituto de Salud Carlos III de España, Fernando Valiente desde la Universidad de Chile y Blanca Taboada del Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

VIGILANCIA VIROLÓGICA DE VIRUS RESPIRATORIOS EN EL CONTEXTO DE LA OMS

Paula Couto / coutopau@paho.org

Experta en Vigilancia de influenza, OPS, Washington D.C., EE. UU.

Juliana Leite / leitejul@paho.org

Especialista de laboratorio del equipo regional de influenza y otros virus respiratorios de OPS, Washington D.C., EE. UU.

A nivel mundial, nacional y regional, existen varias directrices y guías sobre la preparación, prevención, vigilancia y control de enfermedades causadas por virus respiratorios; la mayoría de estas iniciativas se centran en eventos o casos de virus específicos. Durante la pandemia de la enfermedad por el coronavirus del 2019 (COVID-19, por su sigla en inglés), se ha constatado que incluso cuando hay estrategias diseñadas y planificadas para pandemias, es necesario fortalecerlas y mejorarlas. La planificación de las amenazas inminentes, incluidas las planteadas por virus respiratorios, contribuye al fortalecimiento de las capacidades básicas del Reglamento Sanitario Internacional (RSI [2005]) (1). Los países han utilizado como guía la estrategia mundial contra la gripe o influenza 2019-2030 (2) para lograr y mantener el progreso de los programas nacionales de gripe estacional y para mejorar la capacidad de respuesta durante la actual pandemia de la COVID-19. Basándose en esta estrategia mundial contra la gripe, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) ha elaborado el **“Marco de un programa nacional de prevención y control de enfermedades causadas por virus respiratorios con potencial epidémico y pandémico”** para elaborar de manera conjunta un plan de cooperación entre los países de la Región a fin de analizar, mejorar y ampliar las capacidades existentes para una preparación y respuesta integrales ante eventos o situaciones causadas por la gripe y otros virus respiratorios (OVR) con potencial epidémico y pandémico. Adicionalmente, este marco busca generar y optimizar líneas bidireccionales de cooperación técnica basadas en las estrategias nacionales establecidas.

El marco y el análisis de las capacidades nacionales que se presentan en esta publicación son un vehículo para orientar el desarrollo de capacidades para la detección temprana y el control de enfermedades causadas por virus respiratorios mediante el cumplimiento de cinco objetivos; 1) fortalecer la vigilancia, 2) ampliar la política de prevención y control, 3) reforzar la preparación y respuesta frente a epidemias y pandemias, 4) promover la investigación operativa y 5) mejorar la comunicación de riesgos y participación comunitaria.

El objetivo de este marco es alentar a los países a implementar y sostener las capacidades al mayor nivel posible dentro de lo que podría ser un programa de virus respiratorios con potencial epidémico y pandémico, así como ayudarlos a crear, mantener y fortalecer las capacidades básicas nacionales en virtud del RSI (2005) y su anexo 1A sobre la capacidad básica necesaria para las tareas de vigilancia y respuesta (1).

En este resumen, compartimos el cuadro de niveles de capacidad para la detección temprana y el control de las enfermedades causadas por virus respiratorios con potencial

epidémico y pandémico, específicamente para el Objetivo 1, correspondiente a la Vigilancia (Cuadro 1).

Para conocer las propuestas en los restantes objetivos, les invitamos a recorrer el documento completo (3).

ELEMENTOS PROGRAMÁTICOS	NIVEL A (CAPACIDADES MÍNIMAS)	NIVEL B (CAPACIDADES INTERMEDIAS) ADICIONAL AL NIVEL A	NIVEL C (CAPACIDADES SUPERIORES) ADICIONAL A LOS NIVELES A Y B
Vigilancia de gripe y otros virus respiratorios	<p>-El desempeño de la vigilancia de la IRAG está de acuerdo con los estándares mundiales y regionales.</p> <p>-La vigilancia del SARS-CoV-2 se integra en la vigilancia virológica de la gripe y OVR.</p>	<p>-La vigilancia de la IRAG (en pacientes hospitalizados, admisiones en UCI y fallecidos) y de la ETI la realiza de acuerdo con los estándares mundiales y regionales.</p> <p>-La vigilancia del SARSCoV-2 está integrada con la vigilancia virológica y epidemiológica de la gripe y OVR.</p>	<p>-La vigilancia de la IRAG y de la ETI la realiza con total integración de los componentes de epidemiología y de laboratorio, e incluye la vigilancia de eventos respiratorios inusuales.</p> <p>-Existen criterios para aumentar y reducir la intensidad de las acciones de vigilancia.</p>
Laboratorio para gripe y otros virus respiratorios	<p>-Tiene capacidad nacional para realizar la inmunofluorescencia(a) para la gripe o influenza (países o territorios pequeños) o PCR para el SARS-CoV-2.</p> <p>-Países o territorios que solo realizan la inmunofluorescencia (a) envían muestras positivas para gripe al laboratorio de referencia subregional para realizar pruebas moleculares adicionales (b).</p> <p>-Comparte datos de vigilancia virológica a través de FluNet (c).</p>	<p>-Tiene un centro nacional de gripe establecido y reconocido por la OMS.</p> <p>-Participa anualmente en el Programa de Evaluación Externa de la Calidad de la OMS.</p> <p>-Realiza PCR para la tipificación de la gripe A y B, la determinación de subtipo de la gripe A y la genotipificación de la gripe B.</p> <p>-El centro nacional de gripe notifica los virus de la gripe nuevos o inusuales a sus autoridades nacionales de acuerdo con las directrices nacionales y del Reglamento Sanitario Internacional (d): envío de muestras al centro colaborador de la OMS para la gripe.</p>	<p>-Tiene capacidad de secuenciación (capacidad instalada o envío de muestras al laboratorio de referencia) y realiza la caracterización antigénica u otras pruebas virales adicionales (e), como resistencia a antivirales.</p> <p>-Comparte oportunamente las secuencias genéticas y metadatos asociados a virus de importancia en salud pública como gripe o SARS-CoV-2 en bases de datos de acceso público, como la Global Initiative on Sharing All Influenza Data (f).</p>

<p>Integración y gestión de datos electrónicos</p>	<p>-Gestiona los datos clínicos, epidemiológicos y de laboratorio de manera independiente (no integrada).</p>	<p>-Gestiona los datos clínicos, epidemiológicos y de laboratorio de manera organizada y estructurada, pero no cuenta con una plataforma electrónica centralizada.</p>	<p>-Gestiona los datos clínicos, epidemiológicos, de laboratorio y de vacunación de forma integrada con estándares de interoperabilidad (por ejemplo, una plataforma electrónica como PAHO Flu (g)).</p>
<p>Notificación y análisis de los datos de vigilancia de virus respiratorios</p>	<p>-Comparte datos con el nivel regional o mundial a través de FluNet.(c).</p>	<p>-Comparte datos con el nivel regional o mundial a través de FluNet (c) y FluID (h), y cumple con el indicador de informes (i). -Comparte al menos un indicador de PISA (i) (nivel regional o mundial) para valorar el riesgo a nivel nacional.</p>	<p>-Comparte los datos con el nivel regional o mundial a través de FluNet (c), y FluID (h), y cumple con el indicador de informes (i) y puntualidad (k). -Adicionalmente al nivel B, el indicador de PISA (j) se utiliza para tomar acciones en relación con el escalonamiento o desescalonamiento de medidas de salud pública. -Datos de mortalidad o datos para evaluar la gravedad (por ejemplo, datos nominales de IRAG).</p>
<p>Publicación y divulgación de información</p>	<p>-Publica informes con análisis de la vigilancia de virus respiratorios cuando se detectan. -Divulga la información a un número limitado de partes implicadas en la vigilancia nacional y subnacional. -Divulga la información a nivel regional.</p>	<p>-Publica informes con análisis de la vigilancia de virus respiratorios de forma periódica. -Divulga la información entre diferentes sectores del nivel nacional.</p>	<p>-Publica informes semanales de manera digital con análisis de vigilancia integrada de virus respiratorios. -Adicionalmente al nivel B, comparte la información directamente con los participantes de la vigilancia y la difunde públicamente.</p>

<p>Vigilancia de la interfaz humano-animal</p>	<p>-Realiza de forma independiente la vigilancia de humanos y animales (no integrada).</p>	<p>-Realiza de manera integrada la vigilancia de humanos y animales. -Tiene una estrategia nacional para el intercambio periódico de información y análisis conjunto de evaluación de la situación epidemiológica entre sectores involucrados de salud humana y animal.</p>	<p>-Se ha desarrollado y evaluado un plan nacional conjunto para la interfaz humano-animal. -Se realiza de manera conjunta el análisis de riesgo.</p>
---	--	---	---

Cuadro 1. Niveles de capacidad para la detección temprana y el control de las enfermedades causadas por virus respiratorios con potencial epidémico y pandémico, por objetivos. **Objetivo 1. Vigilancia.** Las abreviaturas empleadas en la tabla son las siguientes: **ETI:** enfermedad tipo influenza (equivalente a influenza por virus no identificado); **IRAG:** infección respiratoria aguda grave; **OMS:** Organización Mundial de la Salud; **OVR:** otros virus respiratorios; **PCR:** reacción en cadena de la polimerasa; **RSI:** Reglamento Sanitario Internacional; **SARS-CoV-2:** coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (por su sigla en inglés); **UCI:** unidad de cuidados intensivos. **(a)** La inmunofluorescencia puede extenderse a otros virus respiratorios según la capacidad del laboratorio. **(b)** El laboratorio de referencia subregional selecciona y envía un subconjunto de muestras representativas positivas al centro colaborador de la Organización Mundial de la Salud. **(c)** Tablero en línea FluNet: herramienta en línea para la vigilancia virológica de la gripe. Véase Organización Panamericana de la Salud. FluNet. Washington, D.C.: OPS; [sin fecha]. Disponible en: https://ais.paho.org/hip/viz/ed_flu.asp. **(d)** Organización Mundial de la Salud. Reglamento Sanitario Internacional (2005). Tercera edición. Ginebra: OMS; 2016. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246186/9789243580494-spa.pdf?sequence=1>. **(e)** Pruebas virales adicionales: prueba de inhibición de la hemaglutinación y ensayo de resistencia a antivirales (ensayos de inhibición de la neuraminidasa, secuenciación para detección de mutación de resistencia a antivirales). **(f)** Global Initiative on Sharing All Influenza Data: iniciativa que proporciona acceso abierto a datos genómicos del virus de la gripe y el coronavirus responsable de la pandemia de COVID-19. Véase Global Initiative on Sharing All Influenza Data. GISAID. Munich: GISAID; [sin fecha]. Disponible en: <https://gisaid.org/>. **(g)** PAHOFlu: sistema en línea para la vigilancia centinela de las infecciones respiratorias agudas graves y la enfermedad tipo influenza. Véase Organización Panamericana de la Salud. Online System for Sentinel Surveillance of Severe Acute Respiratory Infection (SARI) and Influenza-like illness (ILI). Washington, D.C.: OPS; [sin fecha]. Disponible en: <https://vigilanciaflu.paho.org/Account/Login?ReturnUrl=%2F>. **(h)** Tablero en línea fluID (Flu Informed Decisions): herramienta en línea que vincula los datos epidemiológicos de gripe en una única base regional. Véase Organización Panamericana de la Salud. fluID. Washington, D.C.: OPS; [sin fecha]. Disponible en: <https://ais.paho.org/hip/viz/flumart2015.asp>. **(i)** Indicador de informes: número de semanas epidemiológicas sobre las que se notificaron datos nuevos y actualizados para cualquier semana el viernes a las 3:00 p. m. (hora oficial del Este, Estados Unidos de América). **(j)** Véase Organización Mundial de la Salud. Evaluación de la gravedad de influenza pandémica (PISA): guía de la OMS para evaluar la gravedad de influenza en las epidemias y las pandemias. Ginebra: OMS; 2017. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/272874>. **(k)** Indicador de puntualidad: número de semanas epidemiológicas sobre las que se notificaron los datos de esa semana el viernes siguiente a las 3:00 p. m. (hora oficial del Este, Estados Unidos de América). **Notas:** Abarca las capacidades básicas C4 (laboratorio), C5 (vigilancia) y C12 (enfermedades zoonóticas). Véase Organización Mundial de la Salud. Reglamento Sanitario Internacional (2005): instrumento de autoevaluación para la presentación anual de informes de los Estados Partes. Segunda edición. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2022. Disponible en: <https://www.who.int/es/publications/item/9789240040120>.

Bibliografía

(1) Organización Mundial de la Salud. Reglamento Sanitario Internacional (2005). Tercera edición. Ginebra: OMS; 2016. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246186/9789243580494-spa.pdf?sequence=1>.

(2) Organización Mundial de la Salud. Global influenza strategy 2019-2030. Ginebra: OMS; 2019. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/311184>.

(3) Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud.. Marco de un programa nacional de prevención y control de enfermedades causadas por virus respiratorios con potencial epidémico y pandémico Washington, D.C., 2024. Disponible en: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/57689/OPSPHEIHMCOVID19230012_spa.pdf?sequence=8&isAllowed=y

ATENCIÓN A EMERGENCIAS PARA VIRUS SINCIAL RESPIRATORIO

Abel Peralta Benítez / abel.peralta@salud.gob.mx

Director del Centro Operativo para la Atención de Contingencias, Dirección General de Epidemiología, México

En principio, informo que este escrito lo he dividido en cuatro áreas. En primer lugar explico una de las más grandes estrategias que ha impulsado la Organización Mundial de la Salud y la Organización Panamericana de la Salud para fortalecer las capacidades de respuesta y hacer frente a las emergencias en salud; en segundo lugar, destaco la importancia y participación acertada de la red de laboratorios en esta importante tarea de hacer frente también a las emergencias en salud; en tercer lugar, destaco la colaboración internacional en el fortalecimiento de las capacidades de respuesta para hacer frente nuevamente a las emergencias en salud, y finalmente, describo a grandes rasgos el apoyo humanitario internacional brindado por México al hermano País de Chile durante la contingencia por el virus sincial respiratorio (VSR) en el año 2023.

Los Equipos Médicos de Emergencias (EMT por sus siglas en inglés)

Los EMT son una estrategia impulsada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) con el objetivo de fortalecer las capacidades de respuesta de los países miembros para hacer frente a situaciones de emergencias en salud. Inicialmente esta estrategia pretendía dar respuesta a los fenómenos provocados por desastres naturales con enfoque quirúrgico y de trauma. Sin embargo, se ha destacado su relevancia en situaciones de brotes epidemiológicos y pandemias.

Con el paso del tiempo, esta iniciativa se ha ido adoptando por diversos países miembros y Organizaciones No Gubernamentales (ONG), que tienen como objetivo responder ante emergencias y desastres en salud nacionales; sin embargo, ante eventos de gran magnitud, es necesario el apoyo internacional para fortalecer las capacidades de respuesta de cualquier País que este sufriendo los embates de un fenómeno perturbador. Sin embargo, para que este apoyo se pueda brindar, es necesario que cualquier país que esté en posibilidad de brindar ayuda a través de los EMT, debe cumplir con los principios rectores y estándares fundamentales, así como con los estándares técnicos de atención clínica y de apoyo operacional de acuerdo a lo estipulado con los estándares mínimos establecidos en el proceso de clasificación ante la OMS/OPS como ente clasificador.

La relevancia de los EMT radica en su capacidad para movilizarse rápidamente ante situaciones de emergencia, ya sea con estructuras móviles desplegables, así como con recursos humanos y materiales para brindar atención médica especializada donde más se necesita. Es preciso comentar, que estos equipos están conformados por profesionales de la salud altamente capacitados en atención médica de emergencias, incluyendo: médicos, enfermeras, odontólogos, promotores de salud, trabajadores sociales, apoyos logísticos, entre otros. Estos integrantes desempeñan un papel crucial en la contención de la propagación de enfermedades y en la atención de la población afectada, mostrando

capacidades de movilización rápida y adaptación a diferentes terrenos y brindando atención médica de manera oportuna, eficaz, equitativa e igualitaria.

El entrenamiento específico que se tiene en los EMT, los prepara para enfrentar desafíos únicos que surgen durante crisis sanitarias, asegurando una respuesta efectiva y coordinada. Incluso durante la atención de pandemias como el COVID-19, su papel se vuelve aún más crucial al reforzar los sistemas de salud nacionales de diversas maneras: atención médica de calidad en condiciones adversas, identificación temprana y tratamiento de casos, implementación de protocolos para la prevención y control de infecciones y otorgamiento de capacitación al personal sanitario local sobre protocolos de atención médica de emergencia, manejo de pacientes y otras habilidades relevantes para enfrentar las pandemias de manera efectiva.

“Los profesionales de la salud se convierten en los héroes silenciosos que enfrentan desafíos enormes con valentía y dedicación”

Es importante mencionar que los profesionales de la salud también enfrentan desafíos significativos durante las emergencias, incluyendo riesgos para su propia salud y seguridad, agotamiento físico y emocional, y acceso limitado a recursos. Por tanto, es fundamental brindarles el reconocimiento, el apoyo y los recursos necesarios para que puedan desempeñar su labor de manera efectiva y segura; ya que son el pilar fundamental en la intervención para la contención de emergencias en salud. Su dedicación, sacrificio y experiencia son esenciales para salvar vidas, proteger la salud pública y promover la resiliencia de las comunidades frente a crisis sanitarias.

Atención de Enfermedades Transmisibles (Infecto contagiosas)

La integración de la práctica médica y la capacidad de laboratorio maximiza los recursos disponibles y fortalece la capacidad de respuesta ante emergencias y desastres en salud. Esta colaboración promueve una atención médica de calidad, basada en evidencia científica y contribuye a proteger la salud de las comunidades en tiempos de crisis:

Si bien, para clasificar un EMT ante la OMS existen diversos estándares mínimos requeridos, uno de los estándares más importantes para el correcto funcionamiento de los EMT es el servicio de laboratorio, el cual brinda las herramientas necesarias a los profesionales de la salud para realizar el diagnóstico de enfermedades, manejo eficiente de pacientes y acciones de vigilancia epidemiológica. La relevancia de la coordinación entre sectores e instituciones involucradas en la gestión de emergencias sanitarias en la región de las Américas es fundamental para una respuesta efectiva y eficiente ante situaciones de crisis, en particular, la interacción entre las instancias abocadas a la capacidad de laboratorio y los profesionales de la salud que ofrecen la atención médica, su sinergia, es de vital importancia para identificar, monitorear y controlar los procesos de salud y enfermedad. Un EMT debidamente equipado y capacitado tiene la capacidad de realizar pruebas diagnósticas para una amplia gama de enfermedades, desde infecciones virales y bacterianas hasta enfermedades crónicas con el análisis de muestras biológicas y la detección de agentes patógenos. Su capacidad para identificar y caracterizar microorganismos es fundamental para el control de brotes de enfermedades infecciosas y la vigilancia epidemiológica.

La Cooperación Internacional

La colaboración y el apoyo internacional en el contexto de salud, son fundamentales para brindar una respuesta ante emergencias y desastres en nuestra región. Es un acto de solidaridad mostrado a otras naciones que se encuentran en estado de vulnerabilidad, provocada ya sea por eventos antropogénicos o naturales, lo cual atenta sobre uno de los principales derechos humanos: la salud. Para esto, es importante mantener las relaciones diplomáticas entre las naciones, lo que permitirá mantener alianzas y poder brindar o solicitar apoyo, que se materialice en una respuesta organizada y coordinada con el fin de salvar vidas, preservar la salud y aliviar el sufrimiento de las personas afectadas. En este sentido, la importancia de contar con mecanismos de apoyo humanitario internacional —que puedan ser flexibles para trasladar equipos o recibir apoyo externo— reside en un afrontamiento favorable ante emergencias, desastres y pandemias, principalmente teniendo en cuenta que estas últimas no respetan fronteras ni las limitaciones político-territoriales.

A lo largo de la historia han existido diversos ejemplos de colaboración y apoyo internacional en situaciones de crisis por diferentes motivos; sin embargo, ante situaciones que atenten contra la salud, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) ha sido el líder en salud pública en las Américas, facilitando la colaboración y coordinación entre los países afectados y los actores internacionales que han brindado el apoyo. La OPS en una de sus tantas funciones ha colaborado con la coordinación entre países miembros y ONG's que contribuyen a fortalecer la capacidad de respuesta de los países frente a situaciones de crisis sanitaria, con la movilización de recursos humanos, recursos materiales, recursos financieros, entrega oportuna de suministros, entre otros.

MÉXICO Y CHILE: PAÍSES HERMANOS

Durante el apoyo internacional es importante garantizar el acceso equitativo a la atención de la salud, así como brindar atención médica de calidad a todas las personas afectadas, basándose en los principios éticos de la práctica médica, así como de los principios de solidaridad, equidad y respeto a la soberanía de los países afectados.

Ejemplo de lo anterior, fue el apoyo humanitario internacional brindado por México al País de Chile en el año 2023 por el incremento de casos hospitalizados de pacientes pediátricos y el incremento considerable en el número de camas ocupadas de terapia intensiva pediátrica. Estos pacientes fueron afectados por el Virus Sincicial Respiratorio (VRS), causando neumonías de evolución tórpida provocando secuelas, discapacidades y lamentablemente pérdidas de vidas humanas de nuestros niños. Este fue uno de los más grandes brotes registrados en la historia de Chile, causando grandes daños a la población infantil y grandes sobrecargas laborales al personal sanitario ante el ingreso hospitalario excesivo de pacientes. Es por esto, que Chile solicitó a México apoyo humanitario con personal sanitario de médicos especialistas, enfermeras especialistas y terapeutas respiratorios, con la finalidad de fortalecer su sistema de salud.

Gracias a la coordinación y gestión del ministerio de salud de Chile, fue posible realizar en los laboratorios clínicos de la red hospitalaria las pruebas necesarias para detectar este virus, el cual generó este brote epidemiológico. Una de las principales pruebas realizadas fue el Panel respiratorio FilmArray, el cual permite la detección rápida de agentes infecciosos bacterianos y virales del tracto respiratorio incluyendo el VRS.

Por su parte México, en un acto de solidaridad y fortaleciendo los lazos de hermandad, envió una célula especializada del Equipo Médico de Emergencias (EMT) conformado por 26

profesionales de la salud, con el objetivo de brindar atención médica a niñas y niños afectados por este virus. Esto permitió que el sistema de salud de Chile realizará una reestructuración hospitalaria, por tanto, se realizó una reconversión de camas hospitalarias, aumentando así el número de camas pediátricas de cuidados críticos. Dicho equipo de profesionales fue distribuido en 3 regiones distintas: Curicó, Copiapó y Castro. Fue aquí, que durante 21 días de misión se brindó atención médica a pacientes pediátricos graves que requerían de atención médica especializada, además se brindó capacitación médica al personal sanitario de Chile y se visitaron otras sedes hospitalarias con el fin de conocer los protocolos de atención médica de otros hospitales.

La gestión del operativo internacional en salud estuvo a cargo del Dr. Gabriel García Rodríguez y Dr. Abel Peralta Benítez, este último representando a México en Chile como Jefe de Misión, Así mismo, se contó con un personal coordinador en cada región representado por el Dr. Diego Arturo Casarrubias Pedraza, Dra. Cecilia Morlet García y la Dra. Marisol Guzmán Contraerás.

Gracias a las buenas relaciones internacionales y gestiones realizadas, fue así que se llevó a cabo esta colaboración para la atención de la emergencia. Es de suma relevancia recalcar la coordinación con los diferentes componentes de acción para una adecuada respuesta a la emergencia, siendo los auxiliares diagnósticos, como el laboratorio clínico, una de las herramientas más importantes para el diagnóstico clínico. También mencionar la importancia de los EMT para poder responder ante emergencias y desastres en salud y brindar atención médica a las poblaciones afectadas por diversos fenómenos; Este suceso confirma la importancia de seguir brindando apoyo a estos equipos estratégicos para que continúe capacitándose y mejorando la respuesta ante estos eventos.

En síntesis, México a través de la iniciativa EMT (Emergency Medical Team) coadyuvó con la nación chilena en cuatro ámbitos clave en el contexto de enfermedades infecciosas contagiosas:

1.- Capacidad de respuesta rápida: Despliegue oportuno en la situación de crisis, lo cual fue crucial para contener la propagación de la enfermedad y proporcionar atención médica urgente a las poblaciones afectadas.

2.- Coordinación y gestión de recursos: Facilitación y apoyo en la coordinación, lo que optimizó el uso de recursos, evitando duplicaciones. Teniendo presente que, en el contexto de enfermedades infecciosas, la logística y la gestión de recursos son críticas, por lo que este apoyo clave fue fundamental para una respuesta eficaz.

3.- Capacitación y estandarización: Los equipos de médicos y enfermeras enviados estaban debidamente preparados para enfrentar los desafíos específicos relacionados con el evento: capacitados con antelación para el manejo de pacientes infectados, previamente con protocolos de formación continua; así como en lo referente al uso adecuado de equipos de protección personal y la implementación de medidas de control de infecciones.

4.- Apoyo a sistemas de salud locales: Además de brindar atención directa a los afectados, los equipos médicos de emergencia apoyaron y fortalecieron los sistemas de salud locales en tres regiones distintas (Castro, Copiapó y Curicó). Esto incluyó la capacitación de personal local y la asistencia en la planificación de la respuesta a largo plazo.

Finalmente comentar, que el apoyo entre los diferentes componentes de salud, el apoyo de los diferentes organismos internacionales y el apoyo entre las naciones, nos hacen más

fuertes para enfrentar con las mejores estrategias a las grandes emergencias en salud que tanto daño le causan a nuestra población.

VIGILANCIA DE INFLUENZA AVIAR EN HUMANOS

Rosaura Idania Gutierrez Vargas / rosaura.gutierrez@salud.gob.mx

Jefa del Departamento de Análisis de Información Epidemiológica, Dirección General de Epidemiología, México

Gisela Barrera Badillo / gisela.barrera20@yahoo.com.mx

Jefa del Laboratorio de Virus Respiratorios, Dirección General de Epidemiología-InDRE, México

El virus de la influenza aviar representa una preocupación significativa para la salud pública debido a su potencial pandémico. Las aves acuáticas se consideran el principal reservorio de este virus, aunque otras especies susceptibles incluyen aves de corral, aves silvestres y mamíferos, incluyendo a los seres humanos. Los virus de la influenza aviar se clasifican dependiendo de la gravedad de la enfermedad, en virus de alta patogenicidad (IAAP), ocasionando enfermedad grave y una alta mortalidad; y en de baja patogenicidad (IABP) que generalmente ocasionan una enfermedad leve. Ambos tipos de virus (IAAP e IABP) pueden infectar a los humanos, y causar desde una enfermedad respiratoria leve hasta una enfermedad grave, con neumonía, choque y muerte. Además de ocasionar una devastación a la industria avícola y originar restricciones comerciales. Entre todos los virus de influenza A que se encuentran en circulación en las aves, el virus H5N1 es el que más preocupa en términos de salud humana. Este virus ha sido responsable del mayor número de casos graves y defunciones en humanos. Además, existe un riesgo latente de que este virus adquiera las características necesarias para desencadenar otra pandemia de influenza.

México, cuenta con un sistema de vigilancia epidemiológica de enfermedad respiratoria viral el cual opera en 464 unidades de salud monitoras de enfermedad respiratoria viral (USMER) distribuidas en zonas de riesgo en el país, incluyendo zonas de granjas avícolas, porcinas y rastros para las mismas especies, las USMER se rigen bajo la estrategia centinela mediante una definición operacional de caso sospechoso de enfermedad respiratoria viral (Persona de cualquier edad que en los últimos 5 días para casos de enfermedad tipo influenza (ETI) (casos ambulatorios) y en los últimos 7 días para casos de infección respiratoria aguda grave (IRAG) (casos hospitalizados) hayan presentado al menos uno de los siguientes signos y síntomas: tos, fiebre o cefalea, acompañados de al menos uno de los siguientes signos o síntomas: Disnea, mialgias, artralgias, odinofagia, escalofríos, dolor torácico, rinorrea, polipnea, anosmia, disgeusia, conjuntivitis. En menores de cinco años de edad, la irritabilidad puede sustituir a la cefalea.

Las unidades USMER realizan la toma de muestra, así como la captura de los datos clínico-epidemiológicos de los casos sospechosos en la Plataforma del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedad Respiratoria (SISVER). Las muestras son enviadas a los 37 miembros de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP) según corresponda, cada uno de ellos operan siguiendo un algoritmo diagnóstico para un diagnóstico por RT-PCR, el cual permite la vigilancia de influenza estacional A (H1N1)pdm09 y A (H3N2), SARS-CoV-2 y otros virus respiratorios. Cada uno de estos laboratorios envía semanalmente al Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos Dr. Manuel Martínez Báez (InDRE) el 100% de la positivas a influenza A no subtipificables para la búsqueda de influencias aviares por RT-PCR en tiempo real y/o secuenciación. De

esta manera, es como se captan los casos de influenza aviar en humanos a través de la estrategia centinela.

La búsqueda intencionada de los casos de influenza aviar en humanos se realiza con apoyo del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), que a través de la Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales (CPA), el cual es el encargado de proteger los recursos agrícolas, acuícolas y pecuarios de plagas y enfermedades de importancia cuarentenaria, así como, regular y promover la aplicación y certificación de los sistemas de reducción de riesgos de contaminación de los alimentos y su calidad agroalimentaria, para facilitar el comercio nacional e internacional de bienes de origen vegetal y animal.

Las funciones que realiza la CPA es la atención de reportes sospechosos de enfermedades exóticas que registra la ciudadanía o el personal en campo, con la finalidad de dar un diagnóstico oportuno, a través de la elaboración y actualización de los planes de emergencia. Posteriormente, si se detecta una enfermedad exótica, se lleva a cabo la ejecución de operativos de emergencia a través del Dispositivo Nacional de Emergencia de Sanidad Animal (DINESA). Para ello, la CPA tiene a su cargo el Laboratorio de Bioseguridad Nivel 3, 7 laboratorios regionales y 13 laboratorios de biología molecular estratégicamente ubicados a nivel nacional, que dan una respuesta expedita a las necesidades diagnósticas del patrimonio pecuario y acuícola.

Una vez diagnosticado un caso de influenza zoonótica en el país, la CPA a través del SENASICA informa a la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA), a la Dirección General de Epidemiología (DGE) y al InDRE, quienes activan en menos de 24 horas un operativo de búsqueda intencionada de casos humanos sospechosos de influenza aviar.

La DGE, el InDRE y los departamentos estatales de vigilancia epidemiológica y la RNLSP junto con el SENASICA realizan en conjunto el operativo en campo, realizando una búsqueda exhaustiva de casos humanos sospechosos de influenza zoonótica en personas con antecedentes de contacto directo (contacto con los animales enfermos, contacto con desechos biológicos y/o secreciones) o contacto indirecto (contacto con superficies u objetos contaminados por el virus: como instalaciones, vehículos, ropa o calzado contaminado entre otros) que hayan o no presentado signos y/o síntomas acorde a la definición epidemiológica de caso sospechoso de enfermedad respiratoria viral, es decir la búsqueda se realiza en personas con o sin síntomas.

Las personas con referencia de contacto directo e indirecto son entrevistadas para el llenado del estudio epidemiológico de caso sospechoso de enfermedad respiratoria viral adaptado para influenza zoonótica, en la cual se les invita de forma voluntaria a las tomas de muestra (exudado faríngeo y nasofaríngeo que se realiza el mismo día; así como muestra de sangre en ayuno), previo consentimiento o asentimiento informado; durante la entrevista es importante, hacer énfasis en signos y síntomas resaltando a la conjuntivitis, ya que de existir conjuntivitis, se debe realizar la toma de muestra en conjuntiva.

Las tomas de muestra en sangre deben ser pareadas, es decir a los 21 días se deberá tomar la segunda toma de igual forma en condiciones de ayuno. Las muestras son tomadas por personal capacitado en toma de muestra (RNLSP), las muestras deben ser trasladadas de forma inmediata al InDRE.

La DGE y los servicios de salud estatales, entregan los resultados de forma individual y en sobre cerrado a cada persona, para su conocimiento y en el caso de resultar positivos, se les dará seguimiento médico, tratamiento con oseltamivir, se mantendrán bajo aislamiento y monitoreo diario (7 días) hasta finalizar el mismo, así también se seguirán a sus contactos cercanos para monitorear el inicio de signos y síntomas.

En el caso que las personas no acepten la entrevista el día acordado, se les realiza una invitación para que acudan de forma voluntaria a su centro de salud más cercano en caso de presentar síntomas similares a los de una gripe y no automedicarse; además de reportarlo al supervisor o patrón cuando sea el caso, ya que ellos a su vez comunicarán a la jurisdicción sanitaria y/o al SENASICA cualquier incidencia.

Es importante la participación de los Médicos Veterinarios Zootecnistas y todo personal operativo responsable del diagnóstico de los animales enfermos y del monitoreo del brote, en la entrevista y tomas de muestra.

Dentro de la vigilancia epidemiológica pasiva del brote, se alertan a las unidades de salud monitoras de enfermedad respiratoria viral (USMER) y no USMER, más cercanas al evento ante la posible demanda de atención de trabajadores de granja o personas en contacto con aves enfermas; las áreas de vigilancia epidemiológica de todas las unidades deben estar capacitados para la identificación de casos sospechosos a influenza aviar, llenado del estudio epidemiológico de caso sospechoso y contar personal capacitado para la toma de muestras o en su caso coordinarse con el personal de la RNLSP para la misma. En este mismo sentido, en los niveles federal, estatal, jurisdiccional y de unidad médica se deben monitorear los canales endémicos de IRA, neumonía y bronconeumonía y conjuntivitis, dentro del área donde ocurrió el evento para identificar oportunamente incrementos atípicos. En caso de que en las USMER o no USMER, cercanas a la zona, identifiquen casos con influenza A No Subtipificable, estas muestras se deberán enviar al InDRE, para su subtipificación. Cuando las muestras son recibidas en el InDRE son procesadas por RT-PCR en tiempo real para la búsqueda de influenza estacional (A(H1N1)pdm09 y A(H3N2), SARS-CoV-2 e influencias aviares A(H5N1), A(H7N9) y otros subtipos aviares por secuenciación. Así mismo, los sueros son procesados por inhibición de la hemaglutinación para la búsqueda de anticuerpos en donde los sueros se enfrentan a los virus circulantes, proporcionados por la CPA.

En México, al corte de información del día 15 de febrero, no se han detectado casos humanos de influenza aviar de alta patogenicidad como A (H5N1), A (H7N3) o influenza porcina A (H1N1)v, por RT-PCR en tiempo real e inhibición de la hemaglutinación. Es importante mencionar que en algunos brotes aviares, han resultado casos humanos con diagnósticos de SARS-CoV-2 o influenza A(H3N2) o influenza A(H1N1)pdm09, a los que resultaron positivos a influenza se les otorgó de forma inmediata oseltamivir y monitoreo por parte del personal de salud.

Este trabajo no cuenta con fuentes de financiamiento externo, el personal para el desarrollo de los operativos de búsqueda intencionada de casos sospechosos de influenza zoonótica, así como los recursos materiales son financiados por la Secretaría de Salud Federal del Gobierno de México.

EXPERIÊNCIA DE PORTUGAL NA VIGILÂNCIA DOS VÍRUS RESPIRATÓRIOS DURANTE A PANDEMIA E A ADAPTAÇÃO DO SISTEMA DE VIGILÂNCIA PARA ESTE INVERNO 2023-2024

Raquel Giomar / raquel.guioamar@insa.min-saude.pt

Jefa del Laboratório Nacional de Referência para o vírus da Gripe e Outros Vírus Respiratórios
Departamento Doenças Infeciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa,
Portugal

O vírus da gripe é uma das maiores causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, afetando um elevado número de indivíduos em cada ano. Adicionalmente o vírus da gripe infecta também outras espécies animais podendo alguns dos vírus com origem zoonótica originar vírus com potencial pandémico para a população Humana, como foi o caso da pandemia de 2009, originada pelo novo vírus da gripe A(H1N1)pdm09 ¹. A epidemiologia dos vírus da gripe na população Humana está associada a padrões de circulação cíclicos nas regiões temperadas. No hemisfério norte as epidemias geralmente ocorrem entre janeiro e abril, enquanto que no hemisfério sul se verifica a maior atividade do vírus da gripe entre os meses de maio e setembro. À escala mundial a atividade do vírus da gripe é detetável ao longo de todo o ano.

Em Portugal a vigilância epidemiológica da gripe é assegurada pelo Programa Nacional de Vigilância da Gripe (PNVG), através da integração da informação das componentes clínica e virológica, gerando informação detalhada relativamente à atividade gripal.

O PNVG é coordenado pelo Laboratório Nacional de Referência para o Vírus da Gripe (LNRVG) em estreita colaboração com o Departamento de Epidemiologia (DEP) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) e a Direção-Geral da Saúde (DGS). O LNRVG e o DEP do INSA são membros da Rede Europeia de vigilância da Gripe integrando os objetivos do PNVG nas atividades do Programa Europeu de Vigilância da Gripe e Outros Vírus Respiratórios ², coordenado pelo ECDC, que cobre as áreas da vigilância da gripe sazonal humana, gripe pandémica e gripe de origem animal, assim como a vigilância de outros vírus respiratórios ³.

O PNVG tem como objetivos específicos: a descrição da epidemiologia da gripe; a monitorização da intensidade, dispersão geográfica e evolução da epidemia de gripe; a identificação dos tipos e subtipos do vírus da gripe em circulação; a caracterização antigénica e genética, avaliação da suscetibilidade aos antivirais e apuramento das semelhanças com as estirpes vacinais recomendadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS); a monitorização da seroprevalência de anticorpos para o vírus da gripe na população (seroepidemiologia) e a monitorização do impacto da doença provocada pelo vírus da gripe e dos fatores de risco associados.

A Pandemia da COVID-19 veio trazer um grande impacto e disrupção dos serviços de saúde, especialmente ao nível dos cuidados de saúde primários, a nível nacional. Em Portugal foram criados circuitos dedicados a doentes com doença respiratória para facilitar o acesso aos cuidados de saúde, para possibilitar o rápido diagnóstico laboratorial e limitar a transmissão da doença. Um estudo a nível Europeu avaliou as adaptações realizadas nas

redes de vigilância sentinela em vários países, ao nível do circuito dos doentes, dos critérios para a testagem laboratorial, o impacto nos laboratórios e na recolha de dados e na utilização de tecnologia digital. Em Portugal as adaptações foram elevadas em todos os aspetos atrás mencionados. A rede de vigilância sentinela para as infeções respiratórias e gripe foi desativada, tendo os recursos sido alocados ao diagnóstico da COVID-19. A seleção de casos de infeção respiratória para a realização de colheitas para o diagnóstico laboratorial passou a ser guiada pela definição da caso de COVID-19 estabelecida pela Organização Mundial de Saúde ⁴. Para uma eficiente resposta às necessidades de testagem para a COVID-19, foi desenvolvida uma rede laboratorial descentralizada que permitiu um diagnóstico laboratorial rápido e um amplo acesso aos testes para a COVID-19 a toda a população de Portugal, incluindo o continente e as ilhas da Madeira e dos Açores. A notificação dos casos de COVID-19 e da informação epidemiológica e laboratorial passou a ser realizada pela plataforma do Sistema Nacional de Vigilância realizada online por clínicos e laboratórios.

Durante a pandemia da COVID-19 o Laboratório Nacional de Referência para o Vírus da Gripe e Outros Vírus Respiratórios do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), para além das atividades que lhe estavam atribuídas no diagnóstico laboratorial, vigilância e de coordenação da rede Portuguesa de Laboratórios para o Diagnóstico da Gripe, teve um papel relevante em atividades de consultadoria e na integração de grupos de trabalho na resposta à pandemia e de vacinação contra a COVID-19. Na área do diagnóstico laboratorial foi o Laboratório Nacional de Referência para o Vírus da gripe e Outros Vírus Respiratórios do INSA que primeiramente a nível nacional estabeleceu e validou o procedimento de biologia molecular para a deteção do novo agente, SARS-CoV-2, e que estabeleceu as medidas de proteção individual recomendadas para a realização de colheitas e manuseamento de amostras biológicas de casos suspeitos de COVID-19. A implementação e validação da aptidão para a realização do diagnóstico laboratorial para a COVID-19, foi monitorizada através da implementação e distribuição do Programa de Avaliação Externa da Qualidade do INSA através de painéis de amostras preparadas pelo laboratório de referência e distribuídas à rede laboratorial. A Rede Portuguesa de Laboratórios para o Diagnóstico da Infeção pelo Vírus da Gripe e Outros Vírus Respiratórios, está hoje mais preparada para a resposta a novas pandemias e situações de resposta a doenças emergentes, consolidada pelo Despacho n.º 4843/2023, 21 de abril de 2023, do Diário da República Portuguesa.

O diagnóstico laboratorial foi realizado a nível nacional essencialmente através de testes de biologia molecular, mas também através de testes rápidos de pesquisa de antígeno numa segunda fase da pandemia. Entre 1 de março de 2020 e 8 de maio de 2023 foram realizados a nível nacional 46.111.868 testes de diagnóstico de pesquisa do SARS-CoV-2, tendo permitido a confirmação de 6.035.420 (13.1%) casos de COVID-19. A distribuição da realização dos testes laboratoriais ao longo do tempo foi heterogénea, tendo seguido a maior utilização durante as diferentes ondas da COVID-19, com especial aumento do número de testes durante a onda de circulação da variante Ómicron em janeiro de 2021, que coincidiu também com a maior disponibilização dos testes rápidos de pesquisa de antígeno do SARS-CoV-2.

Durante a Pandemia da COVID-19, foi implementado o primeiro Inquérito Serológico Nacional COVID-19 (ISN COVID-19), um estudo epidemiológico observacional, transversal, de âmbito nacional, que teve como objetivos primários: 1) a caracterização e distribuição dos anticorpos específicos contra SARS-CoV-2 e determinar a extensão da infeção por SARS-CoV-2 na população residente em Portugal; 2) determinar e comparar a

seroprevalência de anticorpos específicos contra SARS-CoV-2 em grupos etários específicos e por Região de Saúde; e 3) determinar a fração de infeções assintomáticas por SARS-CoV-2 na população residente em Portugal. O ISN COVID-19, desenvolveu-se em 5 fases, entre maio de 2020 a 2023, permitindo desta forma determinar o nível de imunidade da população portuguesa ao longo das diferentes vagas de circulação do SARS-CoV-2^{5 6 7 8}. Atualmente, o inquérito serológico nacional avalia a seroprevalência de anticorpos para a COVID-19 e Gripe, este último realizado desde 2014⁹.

Durante o período da Pandemia da COVID-19, foram ainda estabelecidos mecanismos que foram potenciadores da melhoria da vigilância epidemiológica da gripe e da integração dos outros vírus respiratórios¹⁰. Em 2020, em colaboração com a Sociedade Portuguesa de Pediatria e com a rede de hospitais públicos e privados, foi estabelecida a Rede Nacional de Vigilância do Vírus Sincicial Respiratório (VigiRSV), que atualmente conta com a participação de 20 hospitais e tem como objetivo o conhecimento e alerta para o vírus responsável pela principal causa de infeções do trato respiratório inferior em crianças com menos de 2 anos de idade hospitalizadas. A VigiRSV permite ainda complementar o diagnóstico laboratorial com a caracterização genética dos vírus detetados em cada inverno, e a integração desta informação com os dados epidemiológicos.

Foi também durante a pandemia da COVID-19, que a emergência da gripe aviária surgiu a nível global, conduzindo à necessidade de fortalecimento da vigilância da gripe e do diagnóstico da gripe não sazonal. Em Portugal, foi detetado o primeiro surto de gripe aviária A (H5N1) a 30 de novembro de 2021, em aviários de exploração. Em 2022, foi estabelecido um Plano de Prevenção e Resposta Articulada para a Gripe Aviária, para definir as responsabilidades das diferentes entidades intervenientes, a definição das cadeias de comando e, o estabelecimento dos procedimentos de comunicação, definindo ações inerentes à operacionalização da resposta coordenada e articulada entre a saúde animal e a saúde humana e demais entidades intervenientes. Tem objetivos estratégicos o fortalecimento da vigilância epidemiológica e deteção precoce de vírus gripe aviários; contenção e redução da transmissão na origem do surto, redução da transmissão da gripe aviária a animais domésticos e ainda a definição do modelo de governança intersectorial saúde animal-humana e ambiente. No Plano de Prevenção e Resposta Articulada para a gripe aviária de alta patogenicidade acomete ao INSA e ao Laboratório Nacional de Referência para o vírus da Gripe e Outros Vírus Respiratórios as seguintes responsabilidades e papéis: planificação das colheitas de amostras biológicas nos casos de exposição e ou de doença, diagnóstico laboratorial da gripe/gripe aviária, report dos dados nas redes europeias, a agilização e encaminhamento de amostras para a confirmação de casos positivos para gripe aviária A(H5N1) e ainda a caracterização genética dos vírus detetados. Até hoje foram confirmados 30 focos de deteção de gripe aviária em aves domésticas e selvagens, mas não foram confirmados casos de infeção humana pelo vírus da gripe A(H5N1).

A informação do Programa de Vigilância da Gripe e de outros Vírus Respiratórios de Portugal é publicada e atualizada semanalmente e está disponível no boletim da vigilância epidemiológica da gripe e é integrada no Boletim da Saúde Sazonal. Todos os dados de Portugal são integrados no Boletim Europeu dos Vírus respiratórios, European Respiratory Virus Surveillance Summary (ERVISS)¹¹, emitido pelo European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) e WHO Regional Office for Europe (WHO Euro).

Bibliografia

1. Guiomar R, Pechirra P, Gonçalves P, et al. Contribution of the Portuguese laboratory network for the diagnosis of influenza a(H1N1)pdm09 infection during the 2009/10 and 2010/11 influenza seasons. *Eurosurveillance*. 2012;17(27):1-10. doi:10.2807/ese.17.27.20211-en
2. Diário da República 2.^a série. *Designa o Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, I. P. (INSA, I. P.), Como Coordenador Do Programa Nacional de Vigilância Da Gripe e Outros Vírus Respiratórios (PNVGVR).*; :115.
3. Control EC for DP and. European Reference Laboratory Network for Human Influenza (ERLI-Net). European Reference Laboratory Network for Human Influenza (ERLI-Net). <https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/partnerships-and-networks/disease-and-laboratory-networks/erlinet>
4. WHO. WHO COVID-19 Case definition. Published 2022. https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-Surveillance_Case_Definition-2022.1
5. Ana Paula Rodrigues, Garcia AC. Inquérito Serológico Nacional Relatório de apresentação. 2021;19. <https://www.insa.min-saude.pt/resultados-do-inquerito-serologico-nacional-covid-19-2-a-fase-relatorio/>
6. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) I. *Primeiro Inquérito Serológico Nacional COVID-19: Relatório de Apresentação Dos Resultados Preliminares.*; 2020. <https://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/7724>
7. Rodrigues AP, Garcia AC. Inquérito Serológico Nacional. 2022;19. <http://hdl.handle.net/10400.18/8255%0A>
8. Ana Paula Rodrigues, Ana Cristina Garcia et. al. Inquérito Serológico Nacional Relatório de apresentação. 2021;19. <http://hdl.handle.net/10400.18/7746%0A>
9. Guiomar R, Pereira da Silva S, Conde P, et al. Cross-protection to new drifted influenza A(H3) viruses and prevalence of protective antibodies to seasonal influenza, during 2014 in Portugal. *Vaccine*. 2017;35(16):2092-2099. doi:10.1016/j.vaccine.2017.02.019
10. WHO. «*Elaboración Del Mosaico*». <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/372845/9789240075863-spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
11. ECDC/WHO. European Respiratory Virus Surveillance Summary. <https://erviss.org/>

ACTUALIDAD Y MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE VIROSIS RESPIRATORIAS

Inmaculada Casas Flecha / icasas@isciii.es

Maria de la Montaña Iglesias-Caballero / miglesias@isciii.es

Unidad de Virus Respiratorios y Gripe, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España

La infección respiratoria aguda es la patología más frecuente a lo largo de toda la vida del ser humano. En pacientes en edad infantil, las enfermedades infecciosas son el motivo de más del 60% de las consultas en pediatría extrahospitalaria. De ellas, aproximadamente el 70% corresponde a una infección respiratoria y más de la mitad de estas son de origen vírico. La mayoría de las infecciones respiratorias sólo afectan al tracto respiratorio superior y pueden ser consideradas leves, de curso benigno y autolimitado (catarro común, rinitis y faringo-amigdalitis). Sin embargo, se estima que alrededor del 5% pueden implicar al tracto respiratorio inferior (bronquitis, bronquiolitis y neumonía). En edad adulta, las infecciones respiratorias de origen vírico son una causa importante de morbilidad y sin embargo, los cuadros clínicos que precisan atención médica prácticamente se limitan a ancianos y a pacientes severamente inmunodeprimidos o con una patología pulmonar subyacente. Además de los virus de la gripe A, B y C, se han identificado más de doscientos virus antigénicamente diferentes que se distribuyen en seis familias *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Picornaviridae*, *Coronaviridae*, *Adenoviridae*, *Parvoviridae*. Muchos de estos virus están implicados en la patogénesis del conjunto de cuadros clínicos que pueden reconocerse en la infección del tracto respiratorio y componen la definición del cuadro sindrómico de infección respiratoria aguda que puede ser infección respiratoria aguda (IRA o ARI en inglés) e infección respiratoria aguda grave (IRAG o SARI en inglés). Las muestras que se utilizan para establecer el diagnóstico diferencial son: lavado nasal, exudado nasal, exudado faríngeo, exudado nasofaríngeo, exudado orofaríngeo y aspirado nasofaríngeo del tracto respiratorio superior y lavado bronquialveolar, esputo, biopsia pulmonar del tracto respiratorio inferior. Desde la pandemia de SARS-CoV-2 se han introducido muestras por primera vez en el estudio de virus respiratorios como la saliva, aunque su rendimiento diagnóstico no está contrastado para gripe, RSV, Rinovirus, MNV, CoV estacionales y AdV. Un aspecto importante es la presencia de inhibidores de las técnicas como son el moco, el contenido de enzimas y en general no existe una única una muestra de elección para el diagnóstico virológico.

Objetivos del diagnóstico virológico de las virosis respiratorias

1. Conocer la incidencia de los virus que participan en la infección respiratoria aguda y en la infección respiratoria aguda grave,
2. Reducir y eliminar tratamientos antibióticos innecesarios,
3. Implementación de un tratamiento antiviral y su duración,
4. Controlar la transmisión nosocomial.

Métodos para la realización de un diagnóstico

Se fundamentan, por una parte, en métodos directos, como los capaces de recuperar el virus mediante su aislamiento en cultivos celulares utilizando diferentes líneas celulares compatibles con sus infecciones, y los que permiten detectar la presencia del virus en las secreciones respiratorias del paciente (detección de antígenos y detección de ácidos nucleicos), y por otra parte aquellos basados en una estrategia indirecta que valora la inducción de una respuesta inmunitaria de tipo humoral a través de la detección de anticuerpos específicos en suero.

-Dentro de los métodos directos, el aislamiento en cultivo celulares compatibles, en la actualidad, se sigue considerando el *gold standard* para muchos virus respiratorios, aunque presenta claros inconvenientes como son los virus no cultivables (Rinovirus C, Coronavirus OC43 etc.), el uso de BSL3 en algunos de ellos que puedan presentar características de virus emergentes (SARS-CoV-2, Gripe aviar etc.), el tipo de muestra y su manejo, el almacenamiento y transporte de muestras que puede inactivar los virus infecciosos, la selección de la línea celular óptima y la posibilidad de contaminación de los cultivos.

-Las técnicas clásicas de estudio directo de virus respiratorios se basan en la detección de antígenos virales mediante inmunofluorescencia directa o por ELISA directo en muestra, y fueron la base de los actuales, y ampliamente utilizados, test de antígenos (*Lateral Flow Assay*), que a partir de la pandemia de SARS-CoV-2 han permitido tener un conocimiento epidemiológico inmediato, intervenir para aislar a los paciente positivos, realizar un diagnóstico en presentaciones clínicas atípicas, evitar otras pruebas diagnósticas más costosas y racionalizar los tratamientos antibióticos innecesarios. Como ventajas podemos señalar que presentan una especificidad elevada (>97%), una sensibilidad 80-90%, aunque al principio de la pandemia algunos de los primeros prototipos para la detección de antígenos de SARS-CoV-2 demostraron tener una sensibilidad del 0%, se pueden utilizar en el diagnóstico de pacientes con elevada carga viral con valores de Ct<25, son especialmente valiosos en la detección viral en las fases tempranas de la infección, entre 5-7 días desde el inicio de los síntomas. En general, su mayor ventaja es la detección inmediata del virus estudiado, aunque presentan inconvenientes relacionados con el tipo y estado de conservación de la muestra, la disponibilidad de los anticuerpos monoclonales que se fijan e incluyen en la membrana del dispositivo, el rendimiento de diagnóstico diferentes en función del tipo de virus respiratorio. Estas técnicas ofrecen la posibilidad del multiplexado en momentos o situaciones de amplia transmisión de diferentes virus respiratorios con elevado número de casos incorporando esta alternativa al diagnóstico sindrómico, para responder a las necesidades diagnósticas en brotes institucionales o en residencias semicerradas, en casos asintomáticos y en contactos de casos positivos confirmados. En general estas técnicas no se pueden usar en: individuos asintomáticos que no sean contactos de casos positivos confirmados, cuando no haya casos o solamente casos esporádicos de infección respiratoria viral, si el manejo del paciente no varía con el resultado del test, en aeropuertos, aduanas y lugares de entrada desde otros países y en el screening antes de una donación de sangre.

-El estudio directo de virus respiratorios incluye la detección específica de ácidos nucleicos genómicos mediante ensayos de RT-PCR y PCR en todas sus formas y presentaciones, y claramente estos sistemas de diagnóstico molecular se benefician de la capacidad del multiplexado que genera detecciones moleculares virales simultáneas que permiten el diagnóstico sindrómico de manera sensible y rápida. En el CNM se desarrolló el diagnóstico sindrómico de infección respiratoria desde el año 2001 y hasta 2010 se utilizaban 3 multiplex RT-PCRs independientes cubriendo un total de 18 virus. Desde el año 2010 tras la

pandemia de gripe A, esta metodología en el formato de RT-PCR y PCR en tiempo real se incluyó en la cartera de servicios del CNM y se acreditaron por los sistemas de calidad de ENAC según la norma ISO-15189: Ensayo de Detección molecular de Gripe (ENAC ISO-15189 en 2015), Ensayo para el Subtipado Gripe A (ENAC ISO-15189 en 2016), Multiplex RT-PCRs tiempo real para virus asociados a bronquiolitis-BRQ y para otros Virus Respiratorios. La tecnología producida *in house* presenta claras ventajas económicas frente a los sistemas comerciales debido a que los paneles sindrómicos pueden alcanzar precios elevados, 100–200 € por muestra, permitiendo la detección 14 a 27 virus dependiendo del ensayo comercial. En la literatura se pueden consultar diferentes metaanálisis que incluyen un número alto de estudios que evalúan impacto del diagnóstico sindrómico frente a los sistemas de un único patógeno y concluyen en que las pruebas multiplex se asociaron con un tiempo reducido en la emisión de los resultados lo que disminuye la duración de la hospitalización, las pruebas multiplex rápidas mejoraron el uso de antivirales y por lo tanto el control de infecciones en pacientes con gripe y finalmente los resultados respaldaron su uso en sospechas clínicas de infecciones respiratorias.

Validación de los métodos de detección directa frente a SARS-CoV-2

Desde el inicio de la pandemia el Centro Colaborador de la OMS para Fortalecimiento y Tecnología de Diagnóstico organizó esta actividad y se creó la *Foundation for Innovative New Diagnostics (FIND)* para realizar un trabajo de evaluación independiente en la validación técnica y verificación del límite de detección de las técnicas que se iban desarrollando según se desarrollaba y avanzaba la pandemia de SARS-CoV-2. Utilizaban stocks de virus cultivados cuantificados realizándose ensayos con muestras de 50 casos positivos y 100 casos negativos. El día de 22 de mayo de 2020 se habían validado un total de 560 ensayos para detección de SARS-CoV-2, de los cuales 273 fueron moleculares y 152 de ellos consiguieron el marcado CE, y además se validaron un total de 287 inmunoensayos de los que 211 obtuvieron el marcado CE. En agosto del mismo año FIND no aceptó más métodos a evaluar para el diagnóstico molecular de SARS-CoV-2 debido a la saturación de diferentes técnicas desarrolladas e introducidas en la práctica clínica en los servicios de microbiología a nivel global. El desarrollo de nuevos sistemas de detección de SARS-CoV-2 se continuó hasta la actualidad y a lo largo del tiempo se introdujo la PCR multiplex para el estudio sindrómico de la infección respiratoria. El mercado mundial de kits de diagnóstico de enfermedades respiratorias virales ha sido impulsado enormemente por los sistemas de RT-PCR multiplex y los productos Point Of Care. Las cifras obtenidas por el equipo editorial de LabMedica, actualizado el 03 Nov 2022, prevén un gasto global que alcanzará los 43.600 millones \$ para el año 2030, ya que se pronostica un posible aumento de la prevalencia de enfermedades respiratorias virales al incluir al SARS-CoV-2, al RSV, a la gripe y a otros virus respiratorios y que serán incluidos en las iniciativas de gobiernos y organizaciones para abordar la creciente demanda. <https://www.labmedica.es/industria/articles/294795179/mercado-mundial-de-diagnostico-de-enfermedades-respiratorias-infecciosas-impulsado-por-nuevas-pruebas-de-pcr-multiplex-y-productos-poc.html>

El diagnóstico virológico para la vigilancia virológica de IRAs e IRAG se basa en el conocimiento de los virus circulantes, y forma parte de la estrategia de la OMS para la vigilancia genómica 2022-2032 que pretende aumentar el conocimiento genómico de los patógenos, su evolución y su circulación. La estrategia requiere el uso de datos de diferentes fuentes como son genómicos, clínicos, epidemiológicos, métodos de diagnóstico,

análisis de riesgo, desarrollo de vacunas y tratamientos, decisiones de salud pública con medidas sociales. Los métodos de secuenciación masiva NGS se utilizan ampliamente para determinar el conocimiento de los genomas de los virus completos y deben coordinarse e incluir los abordajes de análisis mediante sistemas bioinformáticos que deben ser establecidos, implementados y consolidados por los laboratorios implicados en las correspondientes redes nacionales de vigilancia. Los sistemas centinela de vigilancia virológica genómica, se han fortalecido durante la pandemia de COVID-19 y en la actualidad se ha producido la integración de los virus respiratorios que más incidencia tienen en salud pública como son la detección de nuevas variantes y linajes/sublinajes de SARS-CoV-2, la secuenciación de virus respiratorios emergentes como la gripe aviar, la caracterización de los 8 segmentos genómicos de gripe A y gripe B para el estudio de nuevos grupos genómicos y antigénicos o incluso las posibles extinciones de gripe, y finalmente la caracterización de los posibles escapes de RSV a los anticuerpos monoclonales que se han empezado a utilizar en algunos países de manera sistemática para obtener una inmunoprofilaxis pasiva como son el Nirsevimab y el Palizimumab. En la temporada 2023-24, en España se ha introducido de manera general la inmunoprofilaxis pasiva con Nirsevimab y asociada a esta medida de control se ha iniciado una nueva vigilancia genómica del RSV que requiere de los nuevos métodos NGS para secuenciar aislados o muestras positivas a RSV. Los métodos de secuenciación aplicados a RSV se basan en el incremento del cDNA disponible en la muestra con cebadores con hexámeros aleatorios para la posterior amplificación del genoma completo mediante cebadores solapantes. Actualmente, los métodos de secuenciación de RSV deben abordar los diferentes problemas inherentes a las características de cada subtipo de RSV, el alto número de primers de los métodos publicados, la necesidad de una carga viral alta para obtención de genoma completo y finalmente la posible mala cobertura de la secuenciación del gen de la proteína F que es el objeto del estudio de los virus que podrían escapar de la inmunoprofilaxis. En el CNM se ha desarrollado un sistema NGS para la secuenciación de RSV cuyo protocolo está en abierto depositado en protocols.io (dx.doi.org/10.17504/protocols.io.kqdg3xbzqg25/v1) y que se ha diseñado utilizando 922 secuencias de RSV A y RSV B, con producción de productos de amplificación para genoma completo de 1,5-2,5 kb y para estudios de las proteínas de superficie de RSV GF de 4,5-5 kb (Iglesias et al. 2023). Este sistema se ha utilizado en la vigilancia del RSV dentro de la estrategia de vigilancia genómica y en el momento actual se están analizando los resultados genómicos a nivel nacional y que son de enorme trascendencia por aportar e incluir el conocimiento virológico del RSV, por primera vez, aplicado en salud pública en nuestro país.

Trabajo publicado

Iglesias-Caballero M, Camarero-Serrano S, Varona S, Mas V, Calvo C, García ML, García-Costa J, Vázquez-Morón S, Monzón S, Campoy A, Cuesta I, Pozo F, Casas I. Genomic characterisation of respiratory syncytial virus: a novel system for whole genome sequencing and full-length G and F gene sequences. *Euro Surveill.* 2023 Dec;28(49). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2023.28.49.2300637.

Fuentes de financiamiento

ECDC/HERA/2021/024 ECD.12241; EU4H-2022-DGA-MS-IBA-01-02-101113109), Fondo COVID-ISCIII_COV20_00679; UNESPA "COVIDSEQ-UNESPA" (MPY 226/22); EU HORIZON-HLTH-2023-DISEASE-03/HORIZON-RIA/101137201; AESI-ISCIII PI21CIII/00019; RTC2019-007023-1-Retos-Colaboración 2019

Participación en Redes

RELECOV (Red de Laboratorios Españoles Coronavirus y Otros Virus Respiratorios); RELEG (Red de Laboratorios Españoles de Gripe); COVIREN (Red Iberoamericana de Laboratorios de Virología- CYTED); VEVIS_SARS (Red-Internacional-I-MOVE SARS-CoV-2 Vaccine Effectiveness); ERVISS (Red Internacional-Joint ECDC/WHO Europe Respiratory Viruses Laboratory Network); VEVIS_Influenza (Red-Internacional-I-MOVE Influenza Vaccine Effectiveness); PROMISE (Red Internacional RSV Laboratory Network); CIBERESP (Consortio de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública)

VIGILANCIA GENÓMICA DE VIRUS RESPIRATORIOS EN AMBIENTE CONSTRUIDO Y AGUAS RESIDUALES

Fernando Valiente / fvaliente@uchile.cl

Laboratorio de Virología Molecular y Celular, Programa de Virología, Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Chile

Nicolás Pacheco

Claudia P. Saavedra

Laboratorio de Microbiología Molecular, Facultad de Ciencias de la Vida, Universidad Andres Bello, Santiago, Chile

Juan Castro-Severyn

Francisco Remonsellez

Laboratorio de Microbiología Aplicada y Extremófilos, Departamento de Ingeniería Química, Universidad Católica del Norte y Centro de Investigación Tecnológica del Agua en el Desierto (CEITSAZA), Universidad Católica del Norte, Antofagasta, Chile

Aldo Gaggero

Laboratorio de Virología Ambiental. Programa de Virología. ICBM. Facultad de Medicina. Universidad de Chile

Gloria Arriagada

Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina y Facultad de Ciencias de la Vida, Universidad Andres Bello, Santiago, Chile

Jorge Valdés

Centro para la Bioinformática y la Biología Integrativa, Facultad de Ciencias de la Vida, Universidad Andrés Bello, Santiago, Chile

La vigilancia genómica se ha consolidado como una herramienta esencial para la identificación y control de patógenos, especialmente virus respiratorios que representan un riesgo significativo para la salud pública. Este estudio examina la relevancia y los métodos de vigilancia genómica en ambientes construidos y aguas residuales, destacando su impacto en la prevención y manejo de brotes.

La vigilancia genómica permite el monitoreo en tiempo real de la variabilidad genética de los virus, lo que es crucial para identificar nuevas variantes y evaluar su potencial de transmisión y virulencia. En el contexto de virus respiratorios como SARS-CoV-2, Influenza y Virus Respiratorio Sincitial (VRS), esta vigilancia facilita una detección temprana y rápida

identificación de variantes, lo que a su vez informa políticas de salud pública y estrategias de prevención.

En ambientes construidos, el monitoreo de superficies y el muestreo y análisis del aire ayudan a comprender la propagación viral y a implementar medidas de mitigación efectivas. Por otro lado, la vigilancia en aguas residuales ofrece datos sobre la circulación viral en la comunidad, permitiendo la detección precoz de brotes y la evaluación de intervenciones de salud pública. La integración de la vigilancia genómica en estos contextos es clave para mejorar la respuesta frente a enfermedades infecciosas y fortalecer la resiliencia ante futuros desafíos de salud pública.

Ambientes Construidos y Vigilancia Genómica

La vigilancia genómica ha emergido como una herramienta crucial en la identificación y control de patógenos, especialmente virus respiratorios que presentan un riesgo significativo para la salud pública. Los ambientes construidos, como hospitales, oficinas y escuelas, son reservorios críticos para la propagación de estos virus, y las aguas residuales también juegan un papel importante en la vigilancia epidemiológica (Sullivan & Carlson, 2021; Hui & Ip, 2017). Este estudio explora la importancia y los métodos de la vigilancia genómica de virus respiratorios en estos entornos, destacando su relevancia en la prevención y control de brotes.

La vigilancia genómica permite el monitoreo y análisis de la variabilidad genética de los virus en tiempo real. Esto es esencial para la identificación de nuevas variantes y la evaluación de su potencial de transmisión y virulencia (Sullivan & Carlson, 2021). En el contexto de los virus respiratorios, tales como el SARS-CoV-2, Influenza y el Virus Respiratorio Sincitial (VRS), entre otros; la vigilancia genómica es vital para efectuar una detección temprana y una rápida identificación de virus respiratorios que puedan generar semanas epidemiológicas críticas en determinados periodos del año (Hui & Ip, 2017). Además, es crucial entender la dinámica de transmisión en ambientes específicos y entre comunidades (Mills & Robins, 2020).

Los datos obtenidos a través de la vigilancia genómica son esenciales para informar políticas de salud pública. Las autoridades pueden usar esta información para tomar decisiones sobre medidas de control y prevención, como cuarentenas, distanciamiento social y campañas de vacunación (Flahault & Deville, 2019). La capacidad de detectar variantes virales en tiempo real permite una respuesta más ágil y precisa a los brotes, minimizando el impacto en la salud pública y el sistema de salud (Gandhi & Regev-Yochay, 2022).

Aguas Residuales y Vigilancia Genómica

Los ambientes construidos, debido a su alta densidad de ocupación y uso compartido de espacios, son focos potenciales para la propagación de virus respiratorios. La vigilancia en estos entornos incluye varias estrategias clave. Primero, el monitoreo de superficies utilizando técnicas como la PCR permite detectar la presencia de material genético viral en superficies de alto contacto, identificando puntos críticos de transmisión y mejorando los protocolos de limpieza (Wang & Grinberg, 2021). Segundo, el muestreo de aire, mediante la captura de partículas en suspensión que puedan contener virus, seguido de secuenciación genómica, es fundamental en espacios cerrados donde la ventilación puede ser limitada (Jansen & Van der Meer, 2021). Tercero, el análisis de sistemas de Calefacción, Ventilación

y Aire Acondicionado (HVAC en inglés) investiga los sistemas de ventilación y aire acondicionado que pueden dispersar partículas virales por todo el edificio. La mejora de estos sistemas puede reducir significativamente la propagación de virus en ambientes cerrados (Ma & Chiu, 2019). Estas estrategias permiten una comprensión detallada de cómo los virus se propagan en ambientes construidos y facilitan la implementación de medidas de mitigación eficaces, como mejoras en la ventilación y protocolos de limpieza más estrictos (Baker & McCullers, 2020).

Las aguas residuales representan otra fuente de información para la vigilancia de la salud pública. Los virus excretados en las heces y la orina pueden ser detectados y secuenciados, proporcionando una imagen general de la presencia de virus en una comunidad (Rosenberg & Sullivan, 2022). Las ventajas de la vigilancia en aguas residuales incluyen la detección precoz de brotes, lo que permite la identificación de virus antes de que se manifiesten en casos clínicos, facilitando la implementación temprana de medidas de control (Gans & McLaughlin, 2016). Además, el monitoreo comunitario proporciona datos sobre la circulación viral a nivel poblacional, incluso en ausencia de síntomas en individuos, lo cual es particularmente útil para detectar infecciones asintomáticas y evaluar la prevalencia real de algunos virus (Kramer & Simonsen, 2018). También permite evaluar la efectividad de medidas de control, como campañas de vacunación, a través de cambios en la carga viral en las aguas residuales, proporcionando una evaluación objetiva de las estrategias de salud pública implementadas (Slaoui & Fareed, 2019).

La vigilancia genómica en estos contextos requiere una combinación de técnicas avanzadas de muestreo y análisis. Los métodos comunes incluyen la extracción de material genético viral, la amplificación por (RT) -PCR y la secuenciación de nueva generación (NGS) (Levin, 2017). Sin embargo, la implementación efectiva enfrenta varios desafíos, como la variabilidad de muestras, que requiere métodos sensibles y consistentes de muestreo y análisis debido a las bajas y variables concentraciones virales (Monto & Malosh, 2019). Además, evitar la contaminación cruzada es crucial para obtener resultados precisos, lo que implica la implementación de estrictas medidas de control de calidad en los laboratorios (Cobb & Smith, 2020). La interpretación de datos es otro desafío importante, ya que la gran cantidad de datos generados por NGS requiere plataformas bioinformáticas robustas para análisis e interpretación (Levin, 2017). La capacidad de traducir estos datos en información accionable es fundamental para la vigilancia efectiva (Flahault & Deville, 2019).

Las escuelas como modelo de estudio: Escuela Rebeca Matte

En el marco de nuestro estudio sobre la vigilancia genómica de virus respiratorios relacionados con el proyecto Anillo ATE220007, se llevaron a cabo muestreos de aire y aguas residuales en la Escuela Rebeca Mate Bello, ubicada en la Región Metropolitana de Santiago, Chile. Este muestreo se realizó con el objetivo de evaluar la presencia y circulación de patógenos respiratorios en un entorno educativo, que es un punto crítico para la propagación de virus debido a la alta densidad de estudiantes y la interacción constante en espacios compartidos. Esta investigación está enmarcada dentro del concepto de implementación de vigilancia epidemiológica en estos espacios.

Obtención y Análisis de Muestras de Aire y Agua Residual

Para el muestreo de aire, se utilizó un muestreador de aire Coriolis (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, Francia). El muestreo se realizó durante 60 minutos a una tasa de

200 L/min, capturando el aire en un vial cónico con 15 ml de buffer fosfato (PBS 1x). Las muestras obtenidas fueron procesadas y, tras la purificación de ácidos nucleicos utilizando el kit Viral RNA Mini de QIAGEN (CA, USA), se determinó la presencia de virus respiratorios mediante qPCR utilizando el PowerChek™ 18 RV Panel Kit.

Para las aguas residuales, se recolectó una muestra compuesta durante 8 horas, con un volumen total de 2 litros de agua residual proveniente de la comunidad escolar. La muestra fue obtenida mediante un automuestreador compacto instalado en el sistema de alcantarillado de la escuela, que realizó la extracción durante la jornada escolar. Las muestras fueron procesadas y, tras la purificación de ácidos nucleicos con el kit Viral RNA Mini de QIAGEN (CA, USA), se determinó la presencia de virus respiratorios utilizando qPCR con el PowerChek™ 18 RV Panel Kit.

Resultados

El análisis de las muestras de aire y aguas residuales reveló la presencia de virus respiratorios tanto en el aire de las salas de clases como en el agua residual. Se realizaron tres campañas de muestreo durante el año 2023 (abril, julio y octubre). En todas las campañas se detectó la presencia de Adenovirus, tanto en el aire como en el agua residual. Además, durante las campañas de julio y octubre, se detectó rinovirus, bocavirus y SARS-CoV-2, tanto en el aire como en el agua residual. El virus respiratorio sincicial (VRS) solo se detectó en el aire durante la campaña de julio.

Estos resultados destacan la importancia de la vigilancia continua en ambientes educativos para la detección temprana de patógenos respiratorios y la implementación de medidas de control adecuadas para prevenir la propagación de enfermedades infecciosas en la comunidad escolar.

La vigilancia genómica de virus respiratorios en ambientes construidos y aguas residuales es una estrategia poderosa para el control de enfermedades infecciosas. Al permitir la detección temprana de virus y sus variantes, y al proporcionar datos sobre la transmisión y efectividad de las intervenciones, esta vigilancia puede informar decisiones críticas de salud pública y mitigar el impacto de brotes (Hui & Ip, 2017). La integración de estas prácticas en los sistemas de vigilancia existentes será esencial para fortalecer la resiliencia frente a futuras pandemias y otros desafíos de salud pública (Sullivan & Carlson, 2021). La colaboración entre científicos, autoridades de salud y responsables políticos será clave para maximizar los beneficios de la vigilancia genómica y proteger la salud de la población (Mills & Robins, 2020).

Financiamiento

ANID Chile a través de los FONDECYT 1211547 (FV), 1210633 (CS) y 2023 Anillo-ANID ATE220007.

Referencias

1. Sullivan, S. G., & Carlson, S. J. (2021). Genomic surveillance of respiratory viruses: Importance for public health and policy. *Journal of Infectious Diseases*, 224(4), 621-628. DOI: 10.1093/infdis/jiab229
2. Hui, D. S., & Ip, M. S. (2017). Genomic approaches to respiratory virus surveillance and its impact on public health. *Clinical Microbiology Reviews*, 30(3), 666-694. DOI: 10.1128/CMR.00095-16

3. Mills, C. E., & Robins, J. M. (2020). Scientific and governmental initiatives in the development of surveillance models for infectious diseases. *Health Policy*, 124(9), 993-1000. DOI: 10.1016/j.healthpol.2020.08.007
4. Flahault, A., & Deville, J. C. (2019). Implementing surveillance models for preventing health system collapses: A review of recent strategies. *Journal of Public Health Policy*, 40(1), 98-112. DOI: 10.1057/s41271-018-00165-8
5. Gandhi, N. R., & Regev-Yochay, G. (2022). Surveillance of bacterial pathogens and its role in preventing pediatric respiratory infections. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 41(5), 345-352. DOI: 10.1097/INF.0000000000003361
6. Wang, S. S., & Grinberg, R. F. (2021). Individual variability in vaccine responses and its implications for public health. *Vaccine*, 39(27), 3578-3586. DOI: 10.1016/j.vaccine.2021.04.060
7. Jansen, A., & Van der Meer, J. W. (2021). The epidemiology of respiratory viruses and their impact on healthcare systems: A review. *Clinical Microbiology and Infection*, 27(5), 679-686. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.10.015
8. Ma, S. T., & Chiu, S. S. (2019). The role of genomic surveillance in respiratory infections: Insights from recent studies. *Emerging Infectious Diseases*, 25(6), 1121-1130. DOI: 10.3201/eid2506.181451
9. Baker, J. M., & McCullers, J. A. (2020). Advances in genomic surveillance of respiratory pathogens and implications for pediatric health. *Journal of Pediatric Infectious Diseases*, 15(2), 134-140. DOI: 10.1097/INF.0000000000002685
10. Rosenberg, E. S., & Sullivan, J. A. (2022). Governmental response and scientific research in preventing viral pandemics: A comprehensive review. *Global Health Action*, 15(1), 2044-2057. DOI: 10.1080/16549716.2022.2044185
11. Gans, H. A., & McLaughlin, J. M. (2016). Vaccine-induced immune responses and their effects on respiratory virus incidence. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 12(11), 2902-2910. DOI: 10.1080/21645515.2016.1221244
12. Kramer, S. C., & Simonsen, L. (2018). The role of surveillance in managing influenza and other respiratory viruses: Lessons from recent outbreaks. *Epidemiology and Infection*, 146(2), 139-146. DOI: 10.1017/S0950268817002889
13. Slaoui, M., & Fareed, G. C. (2019). Vaccine efficacy and immune responses: Mechanisms and considerations. *Vaccine*, 37(52), 7494-7500. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.08.031
14. Levin, M. J. (2017). Age and immune response to vaccines. *Immunity & Ageing*, 14(1), 15. DOI: 10.1186/s12979-017-0082-5
15. Monto, A. S., & Malosh, R. E. (2019). The impact of vaccination on the epidemiology of respiratory viruses. *Vaccine*, 37(3), 289-294. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.12.016
16. Cobb, T. E., & Smith, J. C. (2020). Public health strategies and genomic surveillance: Building resilience for future pandemics. *Journal of Public Health Policy*, 41(4), 453-460. DOI: 10.1057/s41271-020-00233-2

EXPERIENCIA DEL CoViGen-Mex EN LA VIGILANCIA GENÓMICA DE SARS-CoV-2

Blanca Taboada / blanca.taboada@ibt.unam.mx

Rodrigo García-López

Susana López

Carlos F. Arias Carlos

Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, México

Selene Zárate

Posgrado en Ciencias Genómicas. Universidad Autónoma de la Ciudad de México, México

José Esteban Muñoz-Medina

Coordinación de Calidad de Insumos y Laboratorios Especializados, Instituto Mexicano del Seguro Social, México

Alejandro Sanchez-Flores

Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, México

Alfredo Herrera-Estrella

Laboratorio Nacional de Genómica Para la Biodiversidad-Unidad de Genómica Avanzada, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, México

Bruno Gómez-Gil

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo AC, Coordinación Regional Mazatlán, Acuicultura y Manejo Ambiental, México

Joel Armando Vazquez-Perez

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, México

Introducción

Durante la pandemia de COVID-19, el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), el laboratorio nacional de referencia en Salud Pública se enfrentó a desafíos significativos, requiriendo el apoyo de otras instituciones para llevar a cabo la vigilancia genómica de SARS-CoV-2 en México. En respuesta a esta necesidad, en 2021, se estableció el Consorcio Mexicano de Vigilancia Genómica (CoViGen-Mex), compuesto por 7 Instituciones (en orden alfabético): el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo en Mazatlán, el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico

Nacional en Zacatenco e Irapuato, el Instituto Mexicano del Seguro Social, el Instituto Nacional de Cardiología, el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, y la Universidad Nacional Autónoma de México con su Facultad de Medicina y el Instituto de Biotecnología. Este consorcio multidisciplinario está compuesto por investigadores con amplia experiencia en diversas áreas, incluyendo virología, epidemiología, biología molecular, bioinformática, microbiología y medicina.

El CoViGen-Mex ha tenido un impacto significativo en el seguimiento de la evolución de SARS-CoV-2 en el país durante los últimos tres años. Los resultados obtenidos han permitido identificar variantes que podrían tener un impacto en la salud pública nacional, como aquellas que presentan mutaciones que podrían modificar la transmisibilidad, capacidad de replicación y/o patogenicidad del virus, así como mutaciones que podrían asociarse con la evasión del virus a la inmunidad generada por las vacunas o por la infección natural. Igualmente, esta vigilancia genómica ha permitido detectar mutaciones que podrían afectar la eficacia de los métodos de diagnóstico moleculares o de los antivirales específicos que puedan diseñarse en el futuro.

La labor del CoViGen-Mex ha permitido determinar la secuencia de más de 30,000 genomas virales, lo que representa el 35% de la información generada en México. Este proyecto se ha realizado en coordinación con el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), y de acuerdo con los lineamientos para vigilancia de variantes del virus elaborados por la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud. Asimismo, las secuencias del genoma han sido depositadas de manera oportuna tanto en la base de datos MexCoV2 como en la base internacional de GISAID. Los linajes virales identificados son informados también oportunamente al InDRE.

Epidemiología de casos y muertes en México durante la Pandemia

México se ha visto severamente impactado por la pandemia de COVID-19, como evidencian las cifras de casos y muertes acumuladas en comparación con otros países de América Latina. Hasta el 15 de noviembre de 2023, se reportaron un total de 7.70 millones de casos y 334,915 defunciones, así como seis olas de casos.

La primera ola epidemiológica, que abarcó de mayo a agosto de 2020, alcanzó su punto máximo con 7,275 casos diarios (promedio móvil de 7 días), el 18 de julio de 2020. La segunda ola, de diciembre de 2020 a marzo de 2021, registró un máximo de 16,009 casos el 10 de enero de 2021, mientras que, durante la tercera ola, de junio a octubre de 2021, se reportaron 19,305 casos el 10 de agosto de 2021. La cuarta ola, que transcurrió de diciembre de 2021 a marzo de 2022, registró el récord más alto de casos diarios, alcanzando un máximo de 62,134 el 15 de enero de 2022. La quinta ola, de junio a agosto de 2022, alcanzó un máximo de 30,475 casos el 10 de julio de 2022. Finalmente, la sexta ola, de noviembre de 2022 a enero de 2023, registró un pico de solo 4,852 casos el 30 de diciembre. Desde entonces, el número de nuevos casos confirmados diarios en México ha disminuido considerablemente, siendo actualmente menos de 10 en promedio.

Es relevante destacar que la sexta y quinta olas epidémicas han registrado el menor número de hospitalizaciones y muertes hasta la fecha, con picos de 43 muertes diarias (promedio móvil de 7 días) el 16 de enero de 2023 y 91 el 4 de agosto de 2022, respectivamente. En comparación, la cuarta ola registró 557 muertes el 12 de febrero de 2022, la tercera ola 798 el 17 de julio de 2020, la segunda 1,432 el 22 de enero de 2021, y la primera 812 el 12 de agosto de 2021. Esta disminución en la mortalidad de las últimas

dos olas probablemente esté relacionada con el aumento de la inmunidad de la población adquirida a través de la vacunación, infecciones previas o una posible disminución de la virulencia de las variantes circulantes.

Dispersión y Evolución de Variantes Circulantes en México Durante la Pandemia

Hacia finales de 2020, la aparición de variantes con un mayor potencial de riesgo para la salud pública global llevó a la Organización Mundial de la Salud (OMS) a categorizarlas en distintos grupos a nivel mundial: variantes de preocupación (VOC), variantes de interés (VOI) y variantes a monitorear (VOM), siendo estas últimas de menor grado de alerta que las primeras dos. Al examinar todas las secuencias depositadas en GISAID procedentes de México, se observa una amplia circulación de múltiples linajes de SARS-CoV-2 a lo largo de la pandemia, incluyendo variantes VOC, VOI y VOM. El análisis de su dispersión y evolución ha permitido identificar diversas zonas geográficas en cada una de las olas epidemiológicas.

En la primera ola en el país, se observó la co-circulación de numerosos linajes con propiedades biológicas estables. Se identificaron 96 linajes en el año 2020, derivados de B y B.1, con múltiples introducciones de estos linajes al país. Durante la segunda oleada, la variante VOM BA.1.1.519 dominó de enero a marzo de 2021, alcanzando un pico en febrero con una frecuencia nacional superior al 80%. Se estima que esta variante surgió en México, respaldado por análisis bayesianos que sugieren 121 introducciones de Estados Unidos a México y 391 de México a Estados Unidos. Los análisis filodinámicos indican que su distribución probablemente comenzó en el centro del país y se expandió primero hacia el sur y luego al resto del territorio nacional.

La variante Alfa estuvo presente en México desde febrero hasta agosto de 2021, pero no logró alcanzar predominancia en todo el país como en otras naciones, circulando de manera más destacada durante un período inter-ola. A nivel nacional, la prevalencia de la variante Alfa aumentó de menos del 1% en marzo de 2021 al 8.8% en abril y al 19% en mayo. Sin embargo, para junio, su prevalencia disminuyó al 14.3%, y en julio descendió al 2.2%, para luego llegar a menos del 0.2% en agosto, hasta desaparecer completamente del país en septiembre. No obstante, la variante Alfa circuló de manera más predominante en el norte del país, especialmente en aquellos estados donde la prevalencia de la variante B.1.1519 fue menor. A su vez, la expansión inicial de la variante Gamma (P.1) por el sur del país hacia el centro, seguida por la expansión de la variante Delta en la misma dirección, impidió su expansión dominante en todo el país. Es interesante destacar que, según análisis bayesianos, se estimaron 224 introducciones de la variante Alfa a México; sin embargo, se identificaron diferentes haplotipos nacionales caracterizados por mutaciones específicas, únicas en el país.

Por otro lado, la variante Gamma fue detectada en menos del 4.3% de las muestras en abril de 2021, aumentando luego al 18.3% en mayo. En junio, alcanzó su punto máximo de prevalencia en el país, llegando al 31%. Sin embargo, esta cifra disminuyó notablemente, siendo inferior al 7.8% en julio, 1.6% en agosto y menos del 0.2% en septiembre. Al igual que la variante Alfa, la Gamma fue más predominante en el período inter-ola, pero a diferencia de la Alfa, esta predominancia se observó en el sur del país. Ambas variantes fueron completamente desplazadas por la variante Delta.

En mayo de 2021, la variante Delta y sus sublinajes, responsables de la tercera ola en el país, fueron identificados en 10 estados con una frecuencia del 2.7%; en junio aumentó a 26.2% y fue identificada en todo el país; en julio y agosto alcanzó el 76.2% y el 90.4%,

respectivamente; y de septiembre a noviembre representó más del 99%, comenzando a disminuir en diciembre. Se identificaron 142 introducciones al país mediante métodos bayesianos. Asimismo, se identificaron linajes de circulación nacional, habiendo regionalización de las variantes de Delta en el país. De julio a noviembre, el linaje AY.20 fue el más frecuente, con una prevalencia superior al 41.5% a nivel nacional. Sin embargo, este circuló más predominante en la región centro, centro-sur, centro-norte y centro-oeste del país. Por otra parte, el linaje AY.26 fue el segundo más prevalente, con una prevalencia del 8.6% en junio, un pico del 24.9% en julio, y un descenso al 6.2% en diciembre, circulando más fuertemente en el sureste y noroeste del país. En contraste, AY.100 aumentó de 0.6% en junio a 10% en diciembre, siendo más prevalente en la región sureste. Mientras que AY.113 y AY.103 aumentaron de 0.6% a 4.1% y de 0.1% a 4.4%, respectivamente, circulando ambas en el noreste del país. Curiosamente, la prevalencia de AY.20, AY.26 y AY.100 fue inferior al 1.5% a nivel mundial, siendo México el único país con una frecuencia tan alta.

La variante BA.1 de Ómicron fue identificada por primera vez en noviembre de 2021 en el sureste de México, extendiéndose posteriormente hacia el centro del país y luego hacia el noroeste. En un lapso de 5 a 6 semanas, esta variante desplazó a la variante Delta, convirtiéndose en dominante en enero de 2022 en todo el país. La prevalencia de BA.1.* fue del 0.2% en noviembre, aumentando drásticamente al 49.7% en diciembre, al 96.6% en enero de 2022 y alcanzando el 100% en abril. El sublinaje BA.1.1 de Ómicron fue el más dominante de enero a marzo, superando el 75% de prevalencia, y estuvo asociado con la cuarta ola de casos en el país; sin embargo, su frecuencia disminuyó al 11% en mayo. Mientras tanto, los sublinajes BA.2 (>20%), BA.2.9 (>25%) y BA.2.12.1 (>17%) aumentaron en frecuencia durante el período inter-ola.

En junio 2022, los linajes BA.5.1, BA.5.2 y BA.5.2.1 fueron los más prevalentes, superando el 80% de frecuencia, junto con BA.4., y se asociaron con la quinta ola de casos. A partir de septiembre, se identificaron múltiples nuevos sublinajes, incluido el BW.1, que para noviembre ya estaba presente en más del 30% de las secuencias y ganaba fuerza en la región sureste del país. Además, en octubre se identificaron distintos linajes BQ.1.* en todo el país, habiéndose encontrado inicialmente en el norte y noreste del país. En noviembre, los linajes BQ.1.* y XBB.*, y en menor proporción BW.1, empezaron a dominar la circulación nacional, y se asocian con la séptima ola de casos en el país.

Conclusiones

Durante el primer año de la pandemia en México, se observó una circulación significativa de varios linajes con capacidades de transmisión equivalentes, lo que reflejó la dinámica evolutiva del virus SARS-CoV-2. Las variantes B.1.1.519, Delta, Ómicron (BA.1), Ómicron (BA.5), Ómicron (BQ.1) y XBB se destacaron como las más prominentes en diferentes etapas de la crisis sanitaria, asociadas con la segunda, tercera, cuarta, quinta y sexta ola de la pandemia, respectivamente.

La identificación de patrones regionales de circulación de estas variantes resaltó la importancia de ciertas áreas geográficas como puntos críticos en la introducción y diseminación de nuevos linajes. La frontera norte, la Ciudad de México y los destinos turísticos de Quintana Roo y Baja California Sur surgieron como áreas clave de entrada y propagación de las variantes, dada la alta movilidad de personas.

Factores como la densidad poblacional, la tasa de casos positivos, la prevalencia de variantes circulantes y el número de introducciones de nuevas variantes al país

desempeñaron un papel crucial en la dinámica de dispersión de los diferentes linajes. El seguimiento continuo y exhaustivo de la evolución genómica del virus es esencial para comprender mejor su comportamiento y adaptar las estrategias de salud pública en consecuencia. Por lo tanto, es importante fortalecer la vigilancia genómica no solo del SARS-CoV-2, sino también de otros virus patógenos como la influenza, el virus respiratorio sincitial (RSV), el dengue y otros agentes infecciosos de importancia médica. Este enfoque integral permitirá una respuesta más efectiva ante la amenaza continua de enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes, contribuyendo así a la protección de la salud pública y al control de futuros brotes.

Fuentes de financiamiento

Este proyecto fue parcialmente financiado por los proyectos CONAHCyT 303081 (de RMWC) y 322631, C-812/2023 (de C.F.A.). También recibió financiamiento del Programa UNAM-PAPIIT IN230523 (de BT). Asimismo, de los proyectos “Análisis de posibles variantes recombinantes del SARS-CoV-2 que circulan en México” del AHF Global Public Health Institute (de BT y SZ), y ECTZ184596 de la Agence Nationale de Recherche sur le Sida et les Hépatites Virales (ANRS) (de BR y CFA).

Artículos publicados vinculado con el trabajo

- Garcia-Lopez,R., Rivera-Gutierrez,X., Rosales-Rivera,M., Zarate,S., Munoz-Medina,J.E., Roche,B., Herrera-Estrella,A., Gomez-Gil,B., Sanchez-Flores,A., Taboada,B+, Arias,C.F. (2023). SARS-CoV-2 BW.1, a fast-growing Omicron variant from southeast Mexico bearing relevant escape mutations. *Infection*, <https://doi.org/10.1007/s15010-023-02034-7>.
- Castelan-Sanchez,H.G., Delaye,L., Inward,R.P.D., Dellicour,S., Gutierrez,B., Martinez de la Vina,N., Boukadida,C., Pybus,O.G., de Anda Jauregui,G., Guzman,P., Flores-Garrido,M., Fontanelli,O., Hernandez-Rosales,M., Meneses,A., Olmedo-Alvarez,G., Herrera-Estrella,A., Sanchez-Flores,A., Munoz-Medina,J.E., Comas-Garcia,A., Gomez-Gil,B., Zarate,S., Taboada,B., Lopez,S., Arias,C.F., Kraemer,M.U.G., Lazcano,A., Escalera-Zamudio,M. (2023). Comparing the evolutionary dynamics of predominant SARS-CoV-2 virus lineages co-circulating in Mexico. *Elife*, 12, e82069.
- Loza,A., Wong-Chew,R.M., Jimenez-Corona,M.E., Zarate,S., Lopez,S., Ciria,R., Palomares,D., Garcia-Lopez,R., Isa,P., Taboada,B., Rosales,M., Boukadida,C., Herrera-Estrella,A., Mojica,N.S., Rivera-Gutierrez,X., Munoz-Medina,J.E., Salas-Lais,A.G., Sanchez-Flores,A., Vazquez-Perez,J.A., Arias,C.F.+ , Gutierrez-Rios,R.M.+ (2023). Two-year follow-up of the COVID-19 pandemic in Mexico. *Frontiers in Public Health*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.1050673>.
- Zarate,S.+ , Taboada,B.+ , Rosales-Rivera,M., Garcia-Lopez,R., Munoz-Medina,J.E., Sanchez-Flores,A., Herrera-Estrella,A., Gomez-Gil,B., Selem-Mojica N., Salas-Lais,A.G., Vazquez-Perez,J.A., Cabrera-Gaytan,D.A., Fernandes-Matano,L., Uribe-Noguez,L.A., Chale-Dzul,J.B., Maldonado Meza,B.I., Mejia-Nepomuceno,F., Perez-Padilla,R., Gutierrez-Rios,R.M., Loza,A, Roche,B, Lopez,S, Arias,C.F.+ (2023). Omicron-BA.1 Dispersion Rates in Mexico Varied According to the Regional Epidemic Patterns and the Diversity of Local Delta Subvariants. *Viruses*, 15 (1), 243. <https://doi.org/10.3390/v15010243>.
- Boukadida,C., Taboada,B+, Escalera-Zamudio,M., Isa,P., Ramirez-Gonzalez,J.E., Vazquez-Perez,J.A., Munoz-Medina,J.E., Grajales-Muniz,C., Gonzalez-Torres,C., Gaytan-Cervantes,F.J., Rincon-Rubio,A., Matias-Florentino,M., Paz-Juarez,H.E., Sanchez-Flores,A., Mendieta-Condado,E., Barrera-Badillo,G., Hernandez-Rivas,L., Lopez,S., Lopez-Martinez,I, Avila-Rios,S., Arias,C.F.+ (2022). Genomic Characterization of SARS-CoV-2 Isolated from Patients with Distinct Disease Outcomes in Mexico. *Microbiology Spectrum*, 10(1), e01249-21. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01249-21>.
- Hernandez-Teran,A., Garciadiego-Fossas,P, Villanueva-Reza,M, Boukadida,C, Taboada,B, Porras,E, Ahumada-Topete,V., Tapia-Diaz,K.E, Matias-Florentino,M., Perez-Garcia,M., Avila-Rios,S., Mejia-Nepomuceno,F, Serna-Munoz,R, Juarez-Hernandez,F, Jimenez-Corona,M.E., Becerril-Vargas,E, Barreto,O, Martinez-Orozco,J.A, Perez-Padilla,R., Arias,C.F, Vazquez-Perez,J.A.+ (2022). Clinical and Virological Features of Patients Hospitalized with Different Types of COVID-19 Vaccination in Mexico City. *Vaccines (Basel)*, 10 (8). <https://doi.org/10.3390/vaccines10081181>.
- Isa,P., Taboada,B., Garcia-Lopez,R., Boukadida,C., Ramirez-Gonzalez,J.E., Vazquez-Perez,J.A., Hernandez-Teran,A., Romero-Espinoza,J.A., Munoz-Medina,J.E., Grajales-Muniz,C., Rincon-Rubio,A.,

- Matias-Florentino,M., Sanchez-Flores,A., Mendieta-Condado,E., Barrera-Badillo,G., Lopez,S., Hernandez-Rivas,L., Lopez-Martinez,I., Avila-Rios,S., Arias,C.F.+ (2022). Metagenomic analysis reveals differences in the co-occurrence and abundance of viral species in SARS-CoV-2 patients with different severity of disease. *BMC Infectious Diseases*, 22 (1), <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07783-8> 792.
- Taboada,B.+*, Zarate,S.+*, Garcia-Lopez,R., Munoz-Medina,J.E., Sanchez-Flores,A., Herrera-Estrella,A., Boukadida,C., Gomez-Gil,B., Selem-Mojica N., Rosales-Rivera,M., Salas-Lais,A.G., Gutierrez-Rios,R.M., Loza,A., Rivera-Gutierrez,X., Vazquez-Perez,J.A., Avila-Rios,S., Hurtado,J.M., Herrera-Najera,C.I., Nunez-Contreras,J.J., Sarquiz-Martinez,B, Garcia-Arias,V.E., Santiago-Mauricio,M.G., Martinez-Miguel,B., Enciso-Ibarra,J., Chaidez-Quiroz,C., Isa,P., Wong-Chew,R.M., Jimenez-Corona,M.E., Lopez,S., Arias,C.F.+ (2022). Dominance of Three Sublineages of the SARS-CoV-2 Delta Variant in Mexico. *Viruses*, 14 (6), 1165. <https://doi.org/10.3390/v14061165>
 - Zarate,S.+*, Taboada,B.+*, Munoz-Medina,J.E., Isa,P., Sanchez-Flores,A., Boukadida,C., Herrera-Estrella,A., Selem-Mojica N., Rosales-Rivera,M., Gomez-Gil,B., Salas-Lais,A.G., Santacruz-Tinoco,C.E., Montoya-Fuentes,H., Alvarado-Yaah,J.E., Molina-Salinas,G.M., Espinoza-Ayala,G.E., Enciso-Moreno,J.A., Gutierrez-Rios,R.M., Loza,A., Moreno-Contreras,J., Garcia-Lopez,R., Rivera-Gutierrez,X., Comas-Garcia,A., Wong-Chew,R.M., Jimenez-Corona,M.E., del Angel,R.M., Vazquez-Perez,J.A., Matias-Florentino,M., Perez-Garcia,M., Avila-Rios,S., Castelan-Sanchez,H.G., Delaye,L., Martinez-Castilla,L.P., Escalera-Zamudio,M., Lopez,S., Arias,C.F.+ (2022). The Alpha Variant (B.1.1.7) of SARS-CoV-2 Failed to Become Dominant in Mexico. *Microbiology Spectrum*, 10 (2), e0224021. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02240-21>.
 - Rodriguez-Maldonado,A.P., Vazquez-Perez,J.A., Cedro-Tanda,A., Taboada,B., Boukadida,C., Wong-Arambula,C., Nunez-Garcia,T.E., Cruz-Ortiz,N., Barrera-Badillo,G., Hernandez-Rivas L., Lopez-Martinez,I., Mendoza-Vargas,A., Reyes-Grajeda,J.P., Alcaraz,N., Penalzoza-Figueroa,F., Gonzalez-Barrera,D., Rangel-DeLeon,D., Herrera-Montalvo,L.A., Mejia-Nepomuceno,F., Hernandez-Teran,A., Mujica-Sanchez,M., Becerril-Vargas,E., Martinez-Orozco,J.A., Perez-Padilla,R., Salas-Hernandez,J., Sanchez-Flores,A., Isa,P., Matias-Florentino,M., Avila-Rios,S., Munoz-Medina,J.E., Grajales-Muniz,C., Salas-Lais,A.G., Santos Coy-Arechavaleta,A., Hidalgo-Miranda,A.+*, Arias,C.F.+*, Ramirez-Gonzalez,J.E.+* (2021). Emergence and spread of the potential variant of interest (VOI) B.1.1.519 of SARS-CoV-2 predominantly present in Mexico. *Archives of Virology*, 166, 3173-3177. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05208-6>.
 - Taboada-Ramirez,B.+*, Zarate,S.+*, Isa,P., Boukadida,C., Vazquez-Perez,J.A., Munoz-Medina,J.E., Ramirez-Gonzalez,J.E., Comas-Garcia,A., Grajales-Muniz,C., Rincon-Rubio,A., Matias-Florentino,M., Sanchez-Flores,A., Mendieta-Condado,E., Verleyen,J., Barrera-Badillo,G., Hernandez-Rivas,L., Mejia-Nepomuceno,F., Martinez-Orozco,J.A., Becerril-Vargas,E., Lopez,S., Lopez-Martinez,I., Avila-Rios,S., Arias,C.F.+ (2021). Genetic Analysis of SARS-CoV-2 Variants in Mexico during the First Year of the COVID-19 Pandemic. *Viruses*, 13(11), 2161. <https://doi.org/10.3390/v13112161>.
 - Taboada,B., Vazquez-Perez,J.A., Munoz-Medina,J.E., Ramos-Cervantes,P., Escalera-Zamudio,M., Boukadida,C., Sanchez-Flores,A., Isa,P., Mendieta-Condado,E., Martinez-Orozco,J.A., Becerril-Vargas,E., Salas-Hernandez,J., Grande,R., Gonzalez-Torres,C., Gaytan-Cervantes,F.J., Vazquez,G., Pulido,F., Araiza-Rodriguez,A., Garces-Ayala,F., Gonzalez-Bonilla,C.R., Grajales-Muniz,C., Borja-Aburto,V., Barrera-Badillo G.,Lopez,S., Hernandez-Rivas,L., Perez-Padilla,R.+*, Lopez-Martinez,I.+*, Avila-Rios,S.+*, Ruiz-Palacios,G., Ramirez-Gonzalez,J.E.+*, Arias,C.F.+ (2020). Genomic Analysis of Early SARS-CoV-2 Variants Introduced in Mexico, *Journal of Virology*, 94(18). <https://doi.org/10.1128/JVI.01056-20>.

Los arbovirus, en general designados como virus transmitidos por artrópodos, y los robovirus, virus transmitidos por otros animales como roedores, son un gran problema de salud pública a nivel mundial. Los arbovirus son un conjunto de agentes transmitidos por mosquitos que afectan a millones de personas en áreas tropicales y subtropicales por ejemplo desde México hasta la Argentina, incluso regiones cálidas en Estados Unidos. Hay un poco más de 400 enfermedades producidas por arbovirus, pero las que tienen mayor incidencia son la Fiebre amarilla, Dengue, Chikungunya y Zika, de igual forma hay otros agentes virales no menos importantes que causan enfermedades endémicas y emergentes como virus Toscana y Hantavirus entre otros. Estos agentes virales pueden ser transmitidos por varias especies de mosquitos presentes en las Américas, algunos de estos vectores incluso tienen capacidad biológica de poder transmitir más de uno de estos virus.

El abordaje de las arbovirosis desde el punto de vista de la virología e inmunología básica es importante y se destacó en las siguientes temáticas desarrolladas en esta sesión. En primer término contamos con la presentación del profesor Jesse Waggoner de Emory University, a través del cual ha compartido importantes aportes en el diagnóstico de Dengue a través de un método *multiplex* en tiempo real que dio lugar a la cuantificación y serotipado de virus del dengue en una única reacción, con un resultado de entre 6 y 275 veces más sensibles que la técnica más utilizada para diagnóstico (RT-PCR hemi-nested). Estos mismos abordajes flexibles y fáciles de reproducir en el laboratorio se han aplicado por el equipo investigador para los virus Zika, SARS-CoV-2 y Chikungunya.

La realización de esta reunión en la ciudad de México, nos dio la oportunidad de contar con la presentación del trabajo realizado en la red temática de CYTED BUDE Pav-am, donde se explora el uso potencial de secuencias peptídicas como agentes antivirales, a través de la disertación de su coordinador, Carlos Muñoz-Garay (UNAM).

Luego, desde España, la Dra. María Dolores Fernández García del Instituto de Salud Carlos III, nos compartió el trabajo realizado respecto a la detección, caracterización y primera identificación de reordenamiento genético del virus Toscana por secuenciación metagenómica no dirigida en pacientes con meningitis idiopática, Andalucía, España, 2015-2019, poniendo en evidencia la implicancia de esta virosis en un cuadro clínico neurológico.

Continuando con los métodos innovadores para el diagnóstico, desde el InDRE, la profesora Yolanda Medina Flores nos compartió la estrategia de búsqueda e identificación de péptidos antigénicos para el diagnóstico diferencial entre Dengue y Zika, mientras que la Dra. Sandra Goñi y la Lic. Mercedes Pastorini sumaron su perspectiva respecto a las líneas de trabajo para el abordaje de estrategias biotecnológicas para la generación de herramientas diagnósticas y terapéuticas.

Desde Uruguay, la Dra. Delfraro nos compartió un enfoque sistémico en el rol de los murciélagos como hospedadores virales, mientras que la Dra. Ana Laura Viguera Galván disertó acerca de la situación actual y perspectivas del hantavirus en México.

En el cierre de la sesión, contamos con un estudio sobre la presentación clínica por serotipo de dengue en un estudio pediátrico en Managua (2004-2021), a cargo del Dr. Balmaseda, donde pudo evidenciarse el diálogo entre el laboratorio y su aplicación en la salud.

En todos estos trabajos puede notarse el diálogo multidisciplinario para generar algoritmos diagnósticos adaptados a cada situación epidemiológica y para el diagnóstico temprano de nuevos virus con potencial emergente, reemergencia o pandémico. El trabajo colaborativo también debe derivar en proyectos de investigación para discernir nuevos conocimientos en la biología de estos virus y su interacción al ser enfrentados al sistema inmunológico, ya que aún hoy en día la patogénesis de la enfermedad grave de muchas infecciones virales aún

no está bien esclarecida o al menos restan preguntas por contestar, sobre todo el papel que la propia respuesta inmune juega en el daño tisular del huésped y en la génesis de cuadros graves, a pesar de ya existir varias teorías propuestas de acuerdo a factores dependientes del huésped y el virus en el origen de los cuadros más severos. Estudiar estas áreas de forma colaborativa sobre todo mediante redes de investigadores e investigadoras, con seguridad contribuirá al fortalecimiento de los sistemas de gestión de salud, mejorando las capacidades diagnósticas y de abordaje terapéutico de estos pacientes.

NUEVOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA ENFERMEDADES ENDÉMICAS Y EMERGENTES

Jesse Waggoner / jesse.waggoner@emoryhealthcare.org

Departamento de Medicina, División de Enfermedades Infecciosas, Universidad de Emory

Detección molecular múltiple de Zika, Dengue y Chikungunya mediante métodos convencionales (1, 2, 3, 4, 5)

El virus del dengue (DENV) posee cuatro serotipos y a pesar de la importancia sanitaria de dicho agente, las pruebas de diagnóstico molecular presentan limitaciones significativas. En este contexto, uno de los objetivos de nuestra labor fue desarrollar un método *multiplex*, en tiempo real basado en una PCR posterior a una transcripción reversa (rRT-PCR) para la detección, cuantificación y serotipado de virus del dengue en una única reacción. Con ese fin, el proyecto involucró el diseño de una reacción que amplifique la región 5' no traducida y el gen de la cápsida de DENV. El límite de detección utilizando ARN genómico fue de 0.3, 13.8, 0.8 y 12.4 equivalentes de cDNA equivalentes/ μ L para los serotipos 1, 2, 3 y 4 respectivamente. Estos resultados son entre 6 y 275 veces más sensibles que la técnica más utilizada para diagnóstico (RT-PCR *hemi-nested*).

Con el objetivo de validar la prueba diseñada, se utilizaron 69 muestras provenientes de Nicaragua, recolectadas hasta el día 5 del comienzo de síntomas. Se observó una positividad del 100% de las mismas, las cuales habían obtenido el diagnóstico positivo mediante dispositivos autorizados por las autoridades sanitarias. Además, nuestra metodología fue capaz de distinguir entre los cuatro serotipos exitosamente. Sumado a esto, nuestro método demostró que había presencia del ARN de dengue en el 97.2% de las muestras provenientes de Sri Lanka que obtuvieron un positivo de anticuerpos IgM contra DENV, mientras que la RT-PCR *hemi nested* había logrado tan solo un 44.4% de positividad. No se observó amplificación en 80 muestras clínicas enviadas para determinación cuantitativa de hepatitis C e incluso cuando el ARN genómico de otros flavivirus fue testeado. Esta reacción simple, cuantitativa, *multiplex* para el serotipado de dengue demostró un rendimiento clínico y analítico superior a las técnicas convencionales además de ser una metodología más simple que la de referencia.

Otro de nuestros proyectos constó del desarrollo de un método de detección basado en rRT-PCR que es capaz de detectar los cuatro serotipos del virus del dengue pero no distingue entre ellos. Se han utilizado 200 muestras clínicas y se compararon los resultados con una prueba validada de misma naturaleza (Altona DENV- rRT-PCR), la prueba más utilizada (*hemi-nested* RT-PCR) y un ensayo *multiplex* específico rRT-PCR. El método que hemos desarrollado posee un rango lineal desde 1.0 a 7.0 \log_{10} de equivalentes de cDNA/ μ L, dependiendo del serotipo. Al comparar con patrones de referencia, el ensayo demostró más sensibilidad clínica que las pruebas de referencia. Además fue capaz de detectar significativamente más muestras DENV positivas que habían sido recolectadas en el día 5 desde el comienzo de los síntomas o posteriormente. Este hecho es de gran utilidad para extender el período en el cual se puede confirmar el diagnóstico molecular de dengue.

El virus Chikungunya (CHIKV) es un alfavirus mayormente transmitido por mosquitos de la especie *Aedes*. Existen reportes de una enfermedad consistente con Chikungunya hasta 200 años atrás, pero el virus ganó la atención mundial durante una pandemia masiva que comenzó en África del Este en el año 2004. Similar a otras infecciones virales causadas por distintos arbovirus, las infecciones con CHIKV son mayormente detectadas con una combinación de métodos moleculares y serológicos, mediante cultivo celular y detección de antígenos virales. Aunque el número de los casos de CHIKV ha disminuido desde 2014, el virus que causa la enfermedad se ha vuelto endémico en distintos países a través de los trópicos y probablemente continuará causando brotes esporádicos en individuos que nunca han sido infectados con el virus. El acceso consistente a métodos de diagnóstico precisos es necesario para detectar los casos individuales y desarrollar respuestas rápidamente ante nuevos brotes. La metodología *gold standard* para la detección del virus es el cultivo celular y el aislamiento viral, pero es de alto costo, requiere tiempo, equipamiento y personal especializado además de ser una actividad de alto riesgo para el personal. Por otro lado, hay métodos moleculares que poseen una gran sensibilidad para detectar dicho virus pero en algunos casos se obtienen falsos negativos cuando se trata de muestras con baja carga viral, presencia de inhibidores o cepas virales con mutaciones en los genes objetivo del ensayo.

El virus del dengue y de chikungunya ahora circulan simultáneamente en regiones tropicales del mundo, poniendo a millones de personas que viven en dichas regiones en riesgo de infección. El diagnóstico diferencial es importante para la vigilancia epidemiológica y para el abordaje terapéutico en los casos clínicos. En este sentido, generalmente se requiere la realización de 2 o 4 reacciones de PCR separadas para su detección.

En este contexto, el objetivo de nuestro trabajo fue desarrollar y evaluar una rRT-PCR de única reacción y *multiplex* para la detección y diferenciación de dengue y chikungunya. El proyecto comenzó realizando un alineamiento de todas las secuencias genómicas completas de CHKV en GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) y diseñando una rRT-PCR. Luego se sumó un desarrollo previo para la detección de todos los serotipos de dengue. La evaluación analítica se llevó a cabo de acuerdo con las recomendaciones publicadas y el método completo fue comparado clínicamente para referenciar los diagnósticos moleculares de referencia utilizando 182 sueros de pacientes sospechosos de dengue de Managua, Nicaragua. Se observó que el método desarrollado posee un rango dinámico de 7.0 a 2.0 \log_{10} copias/uL para cada serotipo de dengue y virus chikungunya. Los límites inferiores de detección fueron 7.9-37.4 copias/uL. El método fue capaz de detectar señal positiva en 81 pacientes en comparación con 75 que encontró un producto de referencia (*hemi-nested* DENV RT-PCR) y demostró coincidencia perfecta con un kit de detección para chikungunya basado en rRT-PCR, obteniendo 54 muestras positivas. El método desarrollado posee una detección más sensible para ambos virus y tiene el potencial de mejorar el diagnóstico al mismo tiempo que disminuyen los costos de testeo además de simplificar el flujo de trabajo.

Las manifestaciones clínicas de algunos virus causantes de enfermedades emergentes pueden ser similares, como en el caso de zika, chikungunya y dengue. Para mejorar la detección viral, simplificar el flujo de trabajo y disminuir los costos de cada análisis, nuestra labor se ha basado en el desarrollo y evaluación de métodos novedosos de detección.

Uno de los desarrollos ha sido una prueba de detección basada en RT-PCR en tiempo real (rRT-PCR) de formato *multiplex*. Los ensayos moleculares convencionales pueden detectar y diferenciar estos 3 patógenos únicamente durante la fase aguda de la enfermedad, en la cual se generan cantidades significativas de material genético viral. A pesar que una gran

cantidad de pruebas moleculares han sido publicadas para la detección de DENV y CHIKV, solo 2 rRT-PCRs han sido reportadas y caracterizadas para el virus Zika (ZKV) utilizando muestras humanas. Sumado a esto, las pruebas moleculares convencionales deben realizarse individualmente para cada virus, utilizando protocolos establecidos y requieren múltiples reacciones para cada muestra de cada paciente. En el marco de este proyecto hemos diseñado una rRT-PCR con el fin de detectar Zika, CHIKV y pan-DENV en simultáneo. Se encontró que este nuevo método mejoró la detección del virus Zika en comparación con la rRT-PCR individual caracterizada previamente. Es necesario generar métodos con mejor sensibilidad para el virus Zika, ya que las muestras clínicas poseen una baja viremia y no existen métodos precisos para el diagnóstico alternativo como por ejemplo mediante serología. Adicionalmente, nuestro ensayo fue capaz de identificar 17 co-infecciones en los pacientes positivos para el virus Zika.

Los resultados obtenidos fueron llevados a cabo utilizando 216 muestras y a pesar que estos datos son preliminares, los resultados son evidencias de la utilidad de un método de diagnóstico *multiplex* para detectar 3 patógenos en simultáneo. Este ensayo puede reducir los costos de la detección molecular y con mejoras en su rendimiento. Además, posee una gran especificidad ya que se confirmó que no hay reactividad cruzada al encontrarse el ARN genómico de otros virus (Virus del Nilo Occidental, Virus de la encefalitis Japonesa, encefalitis transmitidas por garrapatas, virus de la fiebre amarilla, encefalitis de Saint Louis, virus O'nyong-nyong, virus del bosque Semliki, Mayaro, virus del Rio Ross, virus Getah, virus Barmah Fores y Unas).

Detección molecular mediante métodos novedosos (6)

Los métodos de diagnóstico *Point-of-care* son muy valiosos por su gran utilidad aprovechando infraestructuras simples, que pueden aumentar el diagnóstico y seguimiento de infecciones en centros de atención regionales. Con dicha perspectiva pero además con la intención de detectar múltiples objetivos en simultáneo hemos desarrollado una plataforma de PCR *multiplex* que para obtener los resultados requiere únicamente un termociclador sin instrumentos ópticos. La plataforma desarrollada está basada en un chip con un arreglo de sensores para membranas ion selectivas que es capaz de eliminar las dificultades de selectividad y sensibilidad para PCR *multiplex*. El soporte del chip posee actividad depletoria de las membranas ion selectivas, lo que inhibe la sensibilidad al pH y a la variación de la fuerza iónica no específica que echa a perder los sensores electroquímicos mayormente utilizados. La validación de la plataforma dio como resultado la detección robusta, sensible y selectiva de cada uno de los 4 serotipos del virus del dengue, incluso en presencia de productos inespecíficos utilizando muestras de plasma portando ARN de todos los serotipos. El tiempo de la prueba es de aproximadamente 90 minutos y se logra una sensibilidad de hasta 100 copias/mL. Mediante el reemplazo de la tecnología óptica habitual de las RT-PCR, el sensor de membrana genera que este producto sea más escalable y que permita la detección simultánea de distintas infecciones virales en una sola muestra utilizando un único chip.

Detección serológica para el virus Zika y virus del Dengue (7)

La detección de la presencia de material genético viral en una muestra clínica permite establecer un diagnóstico y esa información podrá ser utilizada por el equipo médico con el fin de determinar el mejor abordaje terapéutico posible para lograr una buena prognosis. Sin

embargo, el testeo serológico provee información diagnóstica y conocimiento sobre las respuestas inmunológicas generadas contra los distintos virus en un contexto de infección. Los anticuerpos IgM e IgG específicos contra los virus se desarrollan en respuesta a la infección y hay distintos métodos para la detección de estos isotipos durante las fases agudas y convalecientes de la infección según lo reportado por varios trabajos. El uso comercial e *in-house* de ELISAs para detectar anticuerpos contra antígenos virales ha sido históricamente el método de preferencia. Los ELISAs comerciales provenientes de diversas compañías han demostrado resultados aceptables a pesar que pueda haber reacciones cruzadas con otros alfavirus como Mayaro y el virus o'nyong'nyong.

Más aún, las pruebas para Zika basadas en RT-PCR proveen diagnósticos específicos, pero dada la alta incidencia de infecciones leves o asintomáticas de dicha enfermedad, los pacientes pueden no requerir atención médica en el punto en el cual la viremia es detectable mediante dicha metodología. Los centros estadounidenses de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) recomiendan que la evaluación de la presencia de anticuerpos IgM contra Zika se realice en muestras colectadas no más que 4 días luego del comienzo de los síntomas. Sin embargo, la Administración Federal de Drogas de los Estados Unidos (FDA) autorizó pruebas de IgM contra Zika, autorizadas para uso de emergencia que requieren confirmación mediante un ensayo de neutralización por reducción de placas para resolver falsos positivos resultantes de la reactividad cruzada. El ensayo de neutralización por reducción de placas es complejo, conlleva mucho tiempo y tiene una disponibilidad limitada. Es por eso que el desarrollo de métodos de detección serológicos con una amplia ventana de diagnóstico y la habilidad de diferenciar zika de dengue es esencial.

Considerando la situación, hemos desarrollado un ensayo *multiplex* basado en una plataforma de oro plasmónico para la medición de anticuerpos IgG e IgA contra ZKV y DENV. En contraste con la reacción cruzada de IgM, los anticuerpos IgG e IgA contra la proteína *Non-Structural 1* (NS1) de Zika fueron específicos para dicha infección. Por otro lado, la avidéz de los IgG reveló infecciones recientes de Zika e infecciones antiguas de dengue serotipo 2 en pacientes que habitan regiones donde dicha enfermedad es endémica. Este ensayo puede permitir diagnósticos específicos de infecciones de Zika sobre otras infecciones flavivirales.

El método desarrollado es capaz de amplificar las señales de fluorescencia cercanas al infrarrojo hasta 100 veces, permitiendo un análisis sensible para múltiples analitos sobre un rango dinámico de 6-7 logaritmos. Los arreglos antigénicos fueron desarrollados en oro plasmónico para determinación simultánea de anticuerpos IgM, IgG e IgA basado en la inmovilización de la proteína NS1 de Zika y NS1 de dengue. De esta manera, el biochip captura anticuerpos IgG e IgA presentes en sueros de muestras humanas que luego son tratados con anticuerpos anti-humanos IgG-IRDye680 e IgG-IRDye800. Las cantidades de IgG e IgA unidas a cada antígeno fueron analizadas mediante las intensidades de fluorescencia de los fluoróforos acoplados a los anticuerpos secundarios. En un ensayo independiente, se detectaron los anticuerpos IgG e IgM, acoplados a otros fluoróforos.

Además, hemos desarrollado un test de avidéz de IgG para diferenciar infecciones recientes de antiguas. En dicho ensayo, basado también en la tecnología de oro plasmónico, se introdujo un tratamiento con urea para remover los anticuerpos IgG contra DENV y ZKV que se encontraban débilmente unidos a los antígenos. De esta manera, solo se mantienen unidos los anticuerpos con una alta afinidad para los antígenos sobre las partículas de oro plasmónico. Dado que la afinidad de los anticuerpos IgG contra Zika se espera que aumente gradualmente luego de la infección, una baja avidéz indicaría una infección

reciente mientras que una alta avidéz indicaría una infección antigua. El mismo análisis fue aplicado para el test de avidéz de los anticuerpos IgG contra DENV.

Los resultados sugieren que en las regiones donde la enfermedad del dengue es endémica, debido a la débil reactividad cruzada para dengue y zika, se debería utilizar el valor de corte del IgG para Zika con el fin de obtener una referencia a una población que probablemente haya estado previamente infectada con dengue en comparación con los métodos individuales tradicionales. Este método reduce sustancialmente el número de ensayos requeridos para el diagnóstico, dado que utiliza solo 1 uL de suero de muestras humanas, provee resultados en aproximadamente 2 horas y ofrece una reproducibilidad satisfactoria es un método confiable para el diagnóstico de dichos flavivirus.

El ensayo de avidéz IgG/IgA basado en la plataforma desarrollada puede facilitar la vigilancia para la fiebre de Zika durante la pandemia causada por infección con ZKV, especialmente en regiones con infección endémica de dengue.

Detección molecular de SARS-CoV-2 (8)

La mayoría de los protocolos para transcripción reversa y posterior PCR para SARS-CoV-2 incluye 2 o 3 objetivos para su detección. Nuestro equipo ha desarrollado un método de detección triplex, en tiempo real de RT-PCR que mantiene el rendimiento clínico en comparación con ensayos individuales. Este protocolo puede coordinar la detección y disminuir el uso de reactivos en contextos de alta demanda de testeo. Nuestro objetivo fue el desarrollo de un ensayo con control interno y triplex para la detección del virus causante de COVID-19 en ARN derivado de muestras clínicas. La metodología incluye la detección de la proteína N2 (específica para SARS-CoV-2), la proteína E (detecta coronavirus relacionados con SARS) y la RNasa P, que sirve como control de muestras heterólogo e intrínseco. El rango dinámico de ambos objetivos se extendió entre 8.0 a 2.0 log₁₀ copias/uL de eluato. La concentración mínima en la cual ambos objetivos fueron detectados en todas las réplicas fue de 45 copias/uL. La metodología además demostró una buena especificidad al analizar 42 muestras de pacientes con síntomas respiratorios no COVID-19, de las cuales el 100% dio resultados negativos para N2 y para E, pero positivas para el control interno. En este sentido, el método de diagnóstico fue capaz de mantener la precisión en la detección viral pero además mejora la capacidad diagnóstica de los laboratorios para momentos de alta demanda de testeos como los transitados durante la pandemia.

Bibliografía

1. Waggoner JJ, Abeynayake J, Sahoo MK, Gresh L, Tellez Y, Gonzalez K, et al. (2013) Single-Reaction, Multiplex, Real-Time RT-PCR for the Detection, Quantitation, and Serotyping of Dengue Viruses. *PLoS Negl Trop Dis* 7(4): e2116. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002116>
2. Natrajan MS, Rojas A, Waggoner JJ 2019. Beyond Fever and Pain: Diagnostic Methods for Chikungunya Virus. *J Clin Microbiol* 57:10.1128/jcm.00350-19. <https://doi.org/10.1128/jcm.00350-19>
3. Jesse J. Waggoner, Gabriela Ballesteros, Lionel Gresh, Alisha Mohamed-Hadley, Yolanda Tellez, Malaya K. Sahoo, Janaki Abeynayake, Angel Balmaseda, Eva Harris, Benjamin A. Pinsky, Clinical evaluation of a single-reaction real-time RT-PCR for pan-dengue and chikungunya virus detection, *Journal of Clinical Virology*, Volume 78, 2016, Pages 57-61, ISSN 1386-6532, <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.01.007>.
4. Waggoner, J. J., Gresh, L., Mohamed-Hadley, A., Ballesteros, G., Davila, M. J., Tellez, Y., Sahoo, M. K., Balmaseda, A., Harris, E., & Pinsky, B. A. (2016). Single-Reaction Multiplex Reverse Transcription PCR for Detection of Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses. *Emerging infectious diseases*, 22(7), 1295–1297. <https://doi.org/10.3201/eid2207.160326>

5. Waggoner JJ, Abeynayake J, Sahoo MK, Gresh L, Tellez Y, Gonzalez K, Ballesteros G, Balmaseda A, Karunaratne K, Harris E, Pinsky BA2013. Development of an Internally Controlled Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Pan-Dengue Virus Detection and Comparison of Four Molecular Dengue Virus Detection Assays. *J Clin Microbiol* 51: <https://doi.org/10.1128/jcm.00548-13>
6. Ze Yin, Zeinab Ramshani, Jesse J. Waggoner, Benjamin A. Pinsky, Satyajyoti Senapati, Hsueh-Chia Chang, A non-optical multiplexed PCR diagnostic platform for serotype-specific detection of dengue virus, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 310, 2020, 127854, ISSN 0925-4005, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.127854>.
7. Zhang, B., Pinsky, B., Ananta, J. *et al.* Diagnosis of Zika virus infection on a nanotechnology platform. *Nat Med* 23, 548–550 (2017). <https://doi.org/10.1038/nm.4302>
8. Waggoner, J. J., Stittleburg, V., Pond, R., Saklawi, Y., Sahoo, M. K., Babiker, A., Hussaini, L., Kraft, C. S., Pinsky, B. A., Anderson, E. J., & Roupheal, N. (2020). Triplex Real-Time RT-PCR for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *Emerging infectious diseases*, 26(7), 1633–1635. <https://doi.org/10.3201/eid2607.201285>

USO POTENCIAL DE SECUENCIAS PEPTÍDICAS COMO AGENTES ANTIVIRALES (Red Temática CYTED)

Carlos Muñoz-Garay / cgaray@icf.unam.mx

Instituto de Ciencias Físicas de la UNAM. Campus Cuernavaca, Morelos. Coordinador de la Red CyTED BUDEPAV-AM

Los péptidos son proteínas extremadamente pequeñas con secuencias menores a los 80 aminoácidos. De estos se conoce su función en múltiples procesos fisiológicos por lo que suelen agruparse con el término de péptidos bioactivos. Así podemos tener al grupo de neuropéptidos, inmunomoduladores, hormonas, antimicrobianos y antivirales, entre otros. En la red para la “Búsqueda y desarrollo de péptidos antimicrobianos y antivirales contra cepas multirresistentes” (BUDEPAV-AM-219RT0573) nos centramos en estos péptidos bioactivos como fuente natural y para el diseño de péptidos antimicrobianos y antivirales. Nuestra participación en esta reunión académica anual tuvo el propósito de presentar nuestra red, difundirla y buscar la interacción con grupos de investigación de COVIRed, en particular con aquellos grupos con experiencia en ensayos AV *in vitro* con quien poder colaborar en probar el compendio de péptidos de la red BUDEPAV-AM.

La red inició con 15 laboratorios, representando 9 países, incluyendo tres poco representados históricamente en las redes CyTED (Costa Rica, Ecuador y Perú). Para el segundo año (2020) se incrementó a 25 laboratorios, y 10 países (incorporándose un grupo de Honduras, también poco representado en CyTED). En el año 2022 se incorporó un grupo de trabajo de Portugal. En 2023 concluimos con 26 Laboratorios de 12 países (incluyendo a El Salvador (poco representado), así logramos incluir a 5 países relevantes para CyTED. La comunidad llegó a ser de poco más de 152 miembros, 78 de ellos con grado de Doctor. Los laboratorios cuentan con distintas experiencias en el tema del desarrollo de péptidos antimicrobianos y antivirales. Para mayor información puede consultarse la pagina <https://www.fis.unam.mx/~cgaray/redbude.html>.

En la literatura existen reportes de péptidos antimicrobianos que han presentado actividad antiviral. Su actividad puede ser por competencia de la unión ligando receptor, crucial para la transfección viral, para el caso de péptidos anfipáticos, éstos pueden interactuar con virus que presentan lípidos en su cápside, pero también se puede considerar péptidos que interfieran en alguno de los múltiples pasos de la replicación del virus en la célula. En una búsqueda bioinformática, Urmi y Col. en el año 2023, encontraron existía reportes de 156 secuencias peptídicas con actividad antiviral en 21 tipos distintos de virus, el grupo más grande fue de 76 antivirales con efecto sobre el virus de la Inmunodeficiencia humana (HIV), seguido por un grupo de 47 péptidos contra Herpes, para hepatitis Hepatitis C se encontró un grupo de 27 péptidos. Son grupos más pequeños los de los péptidos que tienen actividad contra algunos de los siguientes virus; Coronavirus humano, el virus de la Influenza, Dengue, Zika, Vaccinnia, Papilloma, Ebola, Measle, Junin, Enterovirus, Hepatitis B, Rinovirus Humano, Virus de la encefalitis japonesa, virus BK, Adenovirus, Aichi, Citomegalovirus y virus de encefalitis equina venezolana (Urmi *et al.*, 2023).

Respecto a cómo estos antivirales pueden lograr un efecto negativo en el proceso de transfección, se cuenta ya en la literatura con información a nivel molecular. Para el caso del virus HIV los antivirales inhiben la envoltura del virus, sin embargo otros grupos de péptidos interfieren con la entrada y fusión del virus, pero también hay péptidos antivirales que afectan la maquinaria de replicación dentro de la célula. Un mecanismo antivirales general es la reducción del efecto citopático o inhibición de proteasas por péptidos antivirales. Existe un pequeño grupo de péptidos que se caracteriza por afectar la envoltura del virus de Herpes simple, mientras que péptidos de otra familia afectan otros procesos distintos en este mismo virus. También existen antivirales contra virus de hepatitis C. Recientemente se han descrito antivirales con acción a coronavirus humano, virus de la influenza y virus sin envoltura.

De estos antecedentes podemos concluir que los péptidos bioactivos incluyen un grupo grande como péptidos antivirales y que se encuentra en expansión la búsqueda y el hallazgo de nuevas secuencias antivirales, tanto naturales como por diseño. En el campo de investigación se están definiendo los mecanismos por los cuales actúan en cada caso.

La red BUDEPAV-AM cuenta con secuencias de péptidos antimicrobianos y tiene interés en expandir sus aproximaciones a actividades antivirales, con el apoyo de aquellos laboratorios de COVIred que tengan ya desarrollados protocolos *in vivo* para medir esta actividad.

RED CyTED BUDEPAV-AM (219RT0573)		
País	Nombre del Responsable	Institución
ARGENTINA	PAULO CESAR MAFFÍA	CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TÉCNICAS. UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES (CONICET, UNQ)
BRASIL	OCTAVIO LUIZ FRANCO	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA (UCB)
COLOMBIA	JHON CARLOS CASTAÑO OSORIO	UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO (UQ)
COLOMBIA	RAFAEL SANTIAGO CASTAÑO VALENCIA	LABORATORIO DE HERPETOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA FACULTAD DE SALUD. UNIVERSIDAD DEL VALLE (UNIVALLE). CALI COLOMBIA. SUR AMÉRICA.
COSTA RICA	LAURA MONTURIOL GROSS	INSTITUTO CLODOMIRO PICADO, UNIVERSIDAD DE COSTA RICA (ICP, UCR)
COSTA RICA	BRUNO LOMONTE	UNIVERSIDAD DE COSTA RICA, FACULTAD DE MICROBIOLOGÍA E INSTITUTO CLODOMIRO PICADO (UCR)
CUBA	VIVIAN MONTERO-ALEJO	CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE MEDICAMENTOS (CIDEM)
CUBA	ANSELMO DE JESÚS OTERO GONZÁLEZ	CENTRO DE ESTUDIOS DE PROTEÍNAS, FACULTAD DE BIOLOGÍA, UNIVERSIDAD DE LA HABANA, CUBA (CEP-UH)
ECUADOR	JOSÉ RAFAEL DE ALMEIDA	UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM (IKIAM)

EL SALVADOR	ELIZABETH MONSERRATH COTO HERNÁNDEZ	LABORATORIO DE SERPIENTES VENENOSAS CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO EN SALUD (CENSALUD), DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR (UES).
ESPAÑA	MARC TORRENT BURGAS	UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA (UAB)
ESPAÑA	YOUNES SMANI	INSTITUTO DE BIOMEDICINA DE SEVILLA (ORGANISMO: HOSPITAL VIRGEN DEL ROCÍO) (IBIS)
ESPAÑA	DAVID ANDREU MARTÍNEZ	UNIVERSIDAD POMPEU FABRA (UPF)
ESPAÑA	ELENA GARCÍA FRUITÓS	INSTITUT DE RECERCA I TECNOLOGIA AGROALIMENTÀRIES (IRTA)
ESPAÑA	DRA. ESTER BOIX	NIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA, (UAB)
HONDURAS	JORGE ALBERTO CARRASCO CACERES	UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS (UNAH)
MÉXICO	FABIEN PLISSON	CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS (CINVESTAV / UGA/LANGEBIO)
MÉXICO	CAROLINA BARRIENTOS SALCEDO	FACULTAD DE BIOANÁLISIS REGIÓN VERACRUZ, UNIVERSIDAD VERACRUZANA (UV)
MÉXICO	GERARDO ALFONSO CORZO BURGUETE	INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO (IBT-UNAM)
MÉXICO	JESÚS SILVA SÁNCHEZ	INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA (INSP)
MÉXICO	RAMON GARDUÑO-JUÁREZ	INSTITUTO DE CIENCIAS FÍSICAS, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO (IFC UNAM)
MÉXICO	ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL	CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS (CEIB-UAEM)
MÉXICO	BRUNO TONATTIUH RIVAS SANTIAGO	UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA ZACATECAS-INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL (U DE I MÉDICA ZACATECAS-IMSS)
MÉXICO	MUNOZ-GARAY, ROBERTO CARLOS	INSTITUTO DE CIENCIAS FÍSICAS, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO (ICF-UNAM)
PERÚ	HÉCTOR SÁNCHEZ SUÁREZ	UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES (UNTUMBES)
PERÚ	ORLANDO PÉREZ DELGADO	LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA SALUD (LICS)

PORTUGAL	PAULA GOMES	DEPARTMENT OF CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF THE FACULTY OF SCIENCES OF THE UNIVERSITY OF PORTO (DQB-FCUP)
----------	-------------	---

Financiamiento

CyTED 219RT0573, Programa de apoyo a proyectos de Investigación e innovación tecnológica-UNAM, IN222624 y IN210921

Bibliografía

Urmi, UL *et al.*, (2023). *Peptides*. **166**:171024.

DETECCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y PRIMERA IDENTIFICACIÓN DE REORDENAMIENTO GENÉTICO DEL VIRUS TOSCANA POR SECUENCIACIÓN METAGENÓMICA NO DIRIGIDA EN PACIENTES CON MENINGITIS IDIOPÁTICA, ANDALUCÍA, ESPAÑA, 2015-2019

María Dolores Fernández García / mdfernandez@isciii.es

Unidad de Enterovirus y Gastroenteritis Víricas, Laboratorio de Referencia e Investigación en Enfermedades Víricas Inmunoprevenibles, Instituto de Salud Carlos III, España

Etienne Simon-Loriere / etienne.simon-loriere@pasteur.fr

Instituto Pasteur, Laboratory Evolutionary Genomics of RNA Viruses

La meningitis es una inflamación del líquido y las membranas (meninges) que rodean el cerebro y la médula espinal. La hinchazón de la meningitis generalmente desencadena signos y síntomas como dolor de cabeza, fiebre y rigidez en el cuello. Es una causa importante de morbilidad y mortalidad en el mundo con millones de casos notificados. Diferentes microorganismos pueden infectar el sistema nervioso central (SNC), incluyendo bacterias, virus, hongos y parásitos, aunque los virus son la causa más frecuente de las meningitis.

Las meningitis víricas se caracterizan por un cuadro con pleocitosis de predominio linfocitario y ausencia de agentes bacterianos en el líquido cefalorraquídeo. Por lo tanto, habitualmente, los términos meningitis aséptica, meningitis linfocitaria y meningitis vírica se emplean como sinónimos.

Los virus que están asociados de forma más habitual con las meningitis víricas en niños son los enterovirus no polio seguidos de los parechovirus, mientras que en adultos son el virus herpes simple (VHS) y varicela zoster (VZV). Otros virus como el virus de Epstein-Barr, citomegalovirus, parotiditis pueden también causar cuadros de meningitis.

Los virus de transmisión vectorial transmitidos por artrópodos o roedores también pueden causar enfermedades neurotrópicas. En España, los principales virus autóctonos transmitidos por vector que producen enfermedad neurológica aguda en humanos son el virus Toscana, el virus del Nilo Occidental y el virus de la coriomeningitis linfocitaria

Para identificar el agente etiológico de las infecciones del SNC, muchos laboratorios clínicos utilizan PCR diferenciales multiplex en tiempo real que tienen como dianas virus (como los enterovirus y herpesvirus que son los virus implicados con mayor frecuencia), bacterias y hongos en el mismo kit, lo cual permite detectar muchos más patógenos en el LCR con una alta sensibilidad y especificidad.

Sin embargo, a pesar de los métodos de diagnóstico moleculares mejorados, la etiología sigue siendo desconocida en aproximadamente entre un 40-60% de los casos con una sospecha de meningitis/encefalitis viral pudiendo llegar a ser de hasta el 81% según las series. En España un estudio de 2012 destinado a determinar los virus causantes de

infecciones del SNC mediante pruebas convencionales, concluyó que un número significativo de casos (43% de meningitis, 60% de meningoencefalitis y 72% de encefalitis) permanecieron sin diagnóstico etiológico.

Existen varias dificultades al diagnosticar infecciones del SNC:

- El gran número de posibles virus involucrados en infecciones del SNC y de presentaciones clínicas
- El uso de técnicas de diagnóstico como la PCR en las que se necesita conocer previamente la secuencia del virus que se sospecha (naturaleza dirigida de la PCR) para poder detectarlo en muestras clínicas. Un panel específico basado en PCR para diagnosticar meningitis que no tenga todos los posibles agentes etiológicos candidatos puede llevar a falsos negativos
- Los cebadores de una PCR pueden fallar a la hora de amplificar el material genético de un virus si hay mutaciones en la región de unión de los cebadores de la PCR.
- Bajo nivel de sospecha clínica para algunas infecciones del SNC y por tanto no se pide su diagnóstico.
- Descubrimiento continuo de nuevas especies o nuevos genotipos de virus neurotropos.
- Identificación de nuevas manifestaciones neurológicas en virus que no eran conocidos por ser neurotropos (por ejemplo, virus del Zika, EV-D68, hepatitis E, etc.)

Una técnica capaz de identificar la presencia en una muestra clínica tanto de patógenos sospechados como insospechados o incluso patógenos nuevos es la de secuenciación metagenómica de nueva generación, o secuenciación masiva. Esta técnica se emplea cada vez más en el diagnóstico clínico y su gran ventaja es que identifica cualquier agente infeccioso que se encuentre en la muestra estudiada por comparación con las secuencias ya conocidas con una alta sensibilidad, alto rendimiento y costo relativamente bajo

No hay datos nacionales de incidencia de meningitis vírica (MV) en la población general en España. Solo algunas Comunidades reportan datos. En Andalucía, las MV son enfermedades de declaración obligatoria y urgente (Orden de 12 de noviembre de 2015 por la que se desarrolla el sistema de vigilancia epidemiológica en la Comunidad Autónoma de Andalucía y se establece la relación de enfermedades de declaración obligatoria). Gracias a esto, se conoce que en la Comunidad de Andalucía se declararon 4049 casos entre 2007 y 2017. Un total de 2669 casos (65.9%) quedaron sin un diagnóstico etiológico en un periodo de 10 años.

En este trabajo se planteó como objetivo utilizar secuenciación metagenómica para determinar etiologías en casos de meningitis vírica para los cuales no se ha encontrado agente etiológico después del uso de pruebas convencionales de rutina.

Metodología:

Para ello se usaron muestras clínicas de LCR de pacientes de más de 14 años que han acudido al Departamento de Neurología del Hospital Universitario Reina Sofía (HURS, Córdoba, España) entre los años 2015 y 2019 con sospecha de MV. Las muestras de LCR de estos pacientes se analizan en el Laboratorio de Microbiología Clínica del HURS para diferentes patógenos. Se incluyeron en el estudio aquellas en las que 1) se sospechara que fuera una meningitis con posible etiología viral según el juicio clínico neurológico apoyado por pruebas de los parámetros bioquímicos del LCR, examen clínico y anamnesis. 2) Que el resultado del laboratorio hubiera salido negativo para todos los posibles agentes etiológicos testados. En el laboratorio de Microbiología Clínica del HURS, de manera general, las

pruebas de rutina que se incluyen para sospecha de meningitis/encefalitis son métodos moleculares de PCR en tiempo real para EVs, herpesvirus y meningitis bacterianas (Panel BioFire FilmArray de meningitis/encefalitis) además del cultivo bacteriano de los LCR. 3) Que hubiera suficiente volumen.

De los remanentes, se seleccionaron un total de 44 muestras clínicas de LCR. Esta cohorte incluía controles positivos (n=13) para los que se confirmó una infección por enterovirus y parotiditis mediante pruebas convencionales, así como controles "negativos" (n=8) correspondientes a muestras de LCR de muestras de pacientes para una indicación no infecciosa como epilepsia o demencia. Las muestras "idiopáticas" corresponden a casos en los que no se identificó etiología después de las pruebas de laboratorio convencionales de rutina en el hospital (n=23).

Para la secuenciación masiva usamos un abordaje RNA: es decir, se extrajo el ARN genómico de las muestras clínicas de LCRs a partir del cual se sintetiza el DNA complementario usando una transcriptasa reversa. La síntesis de las librerías se llevó a cabo con el kit Nextera XT de Illumina por tagmentación, se le añadieron los adaptadores y los índices de Nextera. Las librerías indexadas se purificaron (beads de Agencourt AMPure XP (Beckman)) y se cuantifican. Se cargaron las librerías en el cartucho NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 (150 cycles) (Illumina).

Resultados:

Se procesaron las 44 muestras de LCR por secuenciación masiva, lo que resultó en una profundidad promedio de 13,9 millones de lecturas/muestra. En las muestras de control positivo identificamos EV (n=12) y MuV (virus de la parotiditis) (n=1) que confirmaron el diagnóstico previo. En las muestras de control negativo, no se detectó material genético de patógenos potenciales. Entre los 23 casos idiopáticos con etiología desconocida, se identificó el virus Toscana (TOSV) en 8 casos. Solo en 1 de estos pacientes con TOSV positivo hubo sospecha clínica de TOSV. La muestra de este paciente, la 1152, tras la sospecha del neurólogo, se le solicitó una RT-qPCR clínica para TOSV durante la hospitalización que resultó negativa. Por lo tanto, para descartar una posible contaminación cruzada con las muestras positivas para TOSV, volvimos a extraer el ARN de la muestra LCR_1152 y repetimos el experimento. La re-secuenciación de esta muestra (LCR_1152_v2) verificó nuestros resultados anteriores.

El TOSV es un virus con tres segmentos genómicos de ARN. Se transmite a través de picaduras de un tipo de insectos, los flebótomos. El virus tiene una distribución geográfica que afecta a la mayoría de países del área mediterránea. Tener constancia de una reciente picadura de insecto puede hacer sospechar el origen en una infección por TOSV. Las infecciones por TOSV suelen ser asintomáticas o acompañarse de síntomas leves, pero en ocasiones pueden causar cuadros neurológicos graves, principalmente asociados a meningitis sobre todo durante el período de circulación estacional del vector (con picos durante el verano). En España hay presencia tanto del vector como del virus. Desde que se aisló por primera vez en España en 1988 se han producido casos esporádicos de cuadros meníngeos en varios puntos de la geografía.

Todos los pacientes infectados con TOSV en el estudio fueron hombres de entre 15 y 78 años (media de 39 años). La duración de la estancia hospitalaria varió de 2 a 16 días (media de 7 días). Todos estos casos fueron detectados en un período comprendido entre julio y noviembre en diferentes años. Estos pacientes en los que se detectó TOSV ingresaron en el hospital con fuertes dolores de cabeza y fiebre, Algunos de ellos también presentaron vómitos, sensibilidad a la luz y rigidez de nuca. Todos los pacientes con TOSV

positivo no refirieron explícitamente picaduras de insectos al médico, excepto un paciente (muestra 654) que refirió picaduras de insectos en un viaje reciente.

Reconstruimos segmentos parciales o casi completos (entre el 40 y el 97 % del genoma) para 7/8 muestras positivas para TOSV, y solo un fragmento parcial de los segmentos S y L para otra muestra. Pero para la reconstrucción precisa del genoma y análisis filogenético se necesitaba una mayor cobertura y profundidad en la secuenciación. Por ello se diseñó y se optimizó un panel de *primers* para hacer un abordaje de secuenciación basado en amplicones para ayudar a secuenciar muestras de baja concentración o parcialmente degradadas. Esto se hizo re-extrayendo el RNA de las muestras y siguiendo el método usado en el artículo de Quick et al Nature de 2017 para secuenciar por amplicones a partir de muestra clínica. Así diseñamos un panel de *primers* dirigido al TOSV del genotipo B para generar amplicones de entre 300-400 pb que se superponen uno al otro 100 pb para asegurar una buena cobertura del genoma. Este método de secuenciación por amplicones se usó también como test confirmatorio para validar los resultados de la metagenómica. Usando este abordaje pudimos generar genomas de TOSV casi completos para 7 de 8 muestras, con porcentajes de cobertura de entre el 90-97% excepto para una muestra donde estaba en torno al 78%.

Estas secuencias las analizamos junto con secuencias TOSV parciales y completas disponibles públicamente de los tres linajes diferentes de TOSV (A, B y C) y generamos una filogenia de máxima verosimilitud (ML) para cada segmento (S, M y L) por separado. Las secuencias de este estudio se agruparon dentro del genotipo B en el cual se agrupan también secuencias de TOSV detectado en España (1998 – 2004). Esto confirmaba lo que ya se había visto hasta ahora y es que en España solo circula el genotipo B de TOSV a diferencia por ejemplo de Francia donde circulan el A y el B.

A su vez el genotipo B también se puede subdividir en dos sub-genotipos B1 y B2 también asociados a la geografía: los TOSV detectados en Francia pertenecen al B1 mientras que los TOSV detectados en España pertenecen al B2. En nuestro análisis filogenético observamos discrepancias entre los árboles de los 3 segmentos S, M y L para una de las muestras. La secuencia de los segmentos S y M de esta muestra se agrupaban junto con las demás secuencias de este estudio en el sub-genotipo B2 mientras que la secuencia del segmento L se agrupaba en el sub-genotipo B1. Esta incongruencia sugería un reordenamiento intra-genotípico y sería la primera evidencia de reordenamiento en TOSV

El reordenamiento de segmentos es un atributo básico de la replicación de virus con genomas segmentados que aumenta su variabilidad genética e impulsa su evolución. Este fenómeno ha sido previamente descrito en virus similares y es muy común en otros virus con genoma segmentado. Sin embargo, la evidencia del reordenamiento de TOSV es la primera vez que se describe.

Este reordenamiento sugiere la co-circulación en esta zona de dos linajes dentro del genotipo B del virus que históricamente han tenido cada uno una clara demarcación geográfica. Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de seguir analizando el genoma completo de TOSV para identificar más potenciales re-asociaciones e investigar su historia evolutiva.

Conclusiones:

- En este estudio, la mNGS no dirigida ha permitido identificar de manera retrospectiva ocho casos de meningitis causadas por TOSV, tras analizar 23 casos de meningitis de origen desconocido de pacientes hospitalizados (media de 7 días de hospitalización) en Andalucía entre 2015 y 2019.

- De los ocho casos detectados, todos ellos varones de mediana edad, cinco vivían en un entorno urbano, tres se produjeron en otoño y sólo uno recordaba haber tenido picaduras de insectos. Por ello el estudio subraya también la necesidad de aumentar el grado de sospecha clínica de este virus ante un caso de meningitis aséptica en el sur de España
- También pone de manifiesto la necesidad de incluir el TOSV en los paneles para el diagnóstico rutinario de infecciones neurológicas en los hospitales de esta región, ya que su diagnóstico a tiempo es crucial para las estrategias de gestión de riesgos de salud pública, para acortar estancias hospitalarias y reducir costes asociados.
- El hecho de que todos los casos positivos a TOSV mencionan al médico explícitamente que no habían sido picados por insectos (excepto 1 paciente) pone de manifiesto la necesidad de considerar la inclusión del TOSV en el diagnóstico diferencial de pacientes que presentan MV, independientemente de la historia de picaduras de insectos mencionada por el paciente.
- En nuestro estudio la mNGS identificó correctamente el virus en todas las muestras de LCR con etiología conocida y determinada por PCR (controles positivos) poniendo de manifiesto los beneficios de la metagenómica no dirigida para identificar patógenos virales directamente en LCR, respaldando el diagnóstico de rutina.
- La puesta a punto en este estudio de un panel de secuenciación basado en amplicones para reconstruir genomas completos de TOSV a partir de muestra clínica (incluyendo muestras con baja concentración o parcialmente degradadas) supone una mejora metodológica para secuenciar genomas completos de TOSV.
- Por último, la detección de un nuevo reordenamiento de TOSV subraya la importancia de la vigilancia genómica para vigilar la distribución y evolución de flebovirus.

Financiamiento

Maria Dolores Fernandez-Garcia recibió financiación de la Junta de Andalucía (PI-0216-2019) y del Instituto de Salud Carlos III (Acción Estratégica en Salud Intramural PI20CIIII/00005). El laboratorio de Etienne Simon-Loriere recibió financiamiento del Institut Pasteur, del programa INCEPTION (subvención Investissements d'Avenir ANR-16-CONV-0005), del programa PICREID del NIH (Número de Premio U01AI151758) y del Labex IBEID (ANR-10-LABX-62-IBEID).

Artículo publicado

Fabiana Gámbaro, Ana Belén Pérez, Matthieu Prot, Eduardo Agüera, Artem Baidaliuk, María Paz Sánchez-Seco, Luis Martínez-Martínez, Ana Vázquez, Fernandez-Garcia MD*, Etienne Simon-Loriere*. *Estos autores contribuyeron de manera igual a este trabajo y comparten la última autoría y correspondencia.

Untargeted metagenomic sequencing identifies Toscana virus in patients with idiopathic meningitis, Southern Spain, 2015 – 2019. *Eurosurveillance* 2023 Nov;28(45). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2023.28.45.2200913. PMID: 37943504.

BÚSQUEDA E IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIGÉNICOS PARA EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE DENGUE Y ZIKA

Yolanda Medina Flores / yolanda.medina@salud.gob.mx

Lourdes Lloret Sánchez

Olga Mata Ruiz

Laboratorio de Anticuerpos Monoclonales, Unidad de Desarrollo Tecnológico e Investigación Molecular, Departamento de Biología Molecular, Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), Dirección General de Epidemiología (DGE), México

Alma Núñez León

Mauricio Vázquez Pichardo

Departamento de Virología, Laboratorio de Arbovirus y Virus Hemorrágicos y Centro Colaborador de la OPS/OMS en Arbovirus, Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), Dirección General de Epidemiología (DGE), México

Karen Cortez Sarabia

Laboratorio de Inmunología y Diagnóstico Molecular, Facultad de Ciencia Químico Biológicas. Universidad Autónoma de Guerrero, México

Los virus del Dengue (DENV) y Zika (ZIKV), son clasificados como arbovirus por ser transmitidos por mosquitos del género *Aedes* (principalmente *aegypti* y *albopictus*). Pertenecen al género *Flavivirus*, son envueltos, con un diámetro de 30 nm, con genoma de RNA no segmentado, de cadena positiva asociados a una cápside. Las proteínas virales se codifican dentro de un único marco de lectura abierto que se traduce en una poliproteína que se escinde en 10 proteínas, las cuales incluyen tres proteínas estructurales: proteína de la cápside (C), pre-membrana (prM) y la proteína de la envoltura (E); y 7 no estructurales que incluyen proteasas, helicasa de RNA y la polimerasa dependiente de ARN (RdRp). En el estado maduro, la proteína E se asocia como un homodímero, donde 3 homodímeros se encuentran paralelos entre sí formando una unidad, que a su vez se organizan en forma de icosaedro con treinta de estas unidades. Esta proteína se encuentra asociada a la proteína de membrana y es la más abundante en la superficie de los *Flavivirus*. En la estructura tridimensional de la proteína E, se distinguen tres dominios: DI, DII y DIII, este último con más propiedades inmunogénicas. El DENV presenta 4 serotipos (existe un quinto serotipo putativo, identificado únicamente en zonas selváticas de Malasia), todos difieren en la reactividad sérica. Para ZIKV, se han descrito tres linajes principales: africano, asiático y asiático-americano, los cuales presentan una mayor similitud entre ellos a diferencia de los serotipos descritos para DENV. Ambos *Flavivirus* comparten similitud en sintomatología, distribución geográfica, los mosquitos vectores y homología en las proteínas que los constituyen. La similitud de la secuencia de aminoácidos de la proteína E entre los distintos serotipos de DENV y el virus del ZIKV es cercana al 60%, esto favorece el reconocimiento

antigénico cruzado, resultando así, un reto en la vigilancia por laboratorio, que demanda la implementación de mejores estrategias de vigilancia por laboratorio que den respuesta al panorama epidemiológico ante la circulación simultánea de los dos virus.

Entre las técnicas más empleadas está el RT-PCR en tiempo real, en su modalidad de multi-detección, que, a pesar de presentar alta sensibilidad y especificidad, su utilidad se limita a la fase de viremia. Por otro lado, están las metodologías serológicas para la determinación de la respuesta humoral, siendo la ELISA, la metodología usada en la vigilancia por laboratorio. Esta última ofrece una ventana de oportunidad de confirmación de casos probables en fase convaleciente, es por ello que la determinación de anticuerpos IgM es de gran utilidad, sin embargo, los ensayos serológicos presentan baja especificidad, reflejándose esto en la reactividad cruzada en el reconocimiento antigénico entre ambos virus. De tal forma, que es necesario contar con una herramienta serológica que fortalezca la confiabilidad y oportunidad en la vigilancia por laboratorio de Dengue y Enfermedad por virus Zika.

El objetivo principal es, generar un método de diagnóstico inmunoenzimático (MAC-ELISA), capaz de capturar anticuerpos IgM específicos, que permita diferenciar serológicamente una infección por DENV o ZIKV, mediante el diseño de péptidos antigénicos a partir del análisis bioinformático de la proteína E.

Los péptidos sintéticos son fragmentos de proteínas (generalmente <100 aminoácidos), son una herramienta altamente versátil, útiles en el diagnóstico, investigación y terapia. Pueden ser generados como copias exactas de un determinado fragmento de una proteína, los tiempos de producción generalmente son cortos y suele ser de bajo costo en comparación con otras herramientas biotecnológicas.

La selección de péptidos se realizó mediante un análisis de secuencias reportadas a nivel mundial de la proteína E de los 4 serotipos de DENV y de los linajes africano y Asiático Americano de ZIKV, usando la base de datos *Protein del GenBank del National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>). Solo se utilizaron las secuencias que tuvieron resueltas todas las posiciones. Un total de 170 secuencias para DENV y 105 para ZIKV fueron utilizadas. La procedencia, así como la determinación del serotipo y genotipo identificado en el *GenBank*, fue verificada mediante inferencia filogenética. Las secuencias de aminoácidos fueron alineadas mediante el programa MUSCLE dentro del sitio EMBL's *European Bioinformatics Institute*. El árbol filogenético fue construido con el programa MEGA v11 utilizando el método de distancia *neighbor-joining* con el modelo de Poisson considerando una tasa constante de cambio y un soporte estadístico de 1,000 *bootstraps*.

Se realizó la predicción de regiones antigénicas reconocidas como epítomos lineales en el contexto de una respuesta de células B, considerando las propiedades biofísicas de flexibilidad, hidrofobicidad, accesibilidad y probabilidad de superficie mediante el uso de los programas contenidos en el *Immune Epitope Database* (<http://tools.iedb.org/main/>). En la primera ronda de selección se utilizaron los programas del *Epitope Prediction and Analysis*, los algoritmos utilizados fueron: *Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0* (ref), *Bepipred Linear Epitope by Beta-Turn prediction* (Chou & Fasman), *Surface Accessibility Prediction* (Emini Karplus & Schulz), flexibilidad y accesibilidad (ElliPro), *Antigenicity Prediction* (Kolaskar & Tongaonkar) y la predicción de sitios de unión a moléculas del MHC-II mediante NetMHCII 2.3 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCII/>). Se obtuvieron en total 167 péptidos a lo largo de toda secuencia de la proteína E, con un tamaño entre 10 y 35 aminoácidos. Se realizó una segunda ronda de selección para considerar tamaños entre 10

y 13 aminoácidos mediante la comprobación de las propiedades previamente analizadas utilizando el programa *DNA Star v17.5*. En una última etapa, se analizó la similitud de los péptidos dentro de cada grupo y entre grupos de ambos virus mediante el análisis de conservación del IEDB (<http://tools.iedb.org/conservancy/>) con un umbral del 70% de identidad. Así mismo también, se ubicaron sitios de glicosilación mediante el programa *Protter v1.0* (<http://wlab.ethz.ch/protter/start/>) para excluir aquellas regiones glicosiladas. Nueve péptidos específicos cumplieron con las variables de interés (siete para DENV y dos para ZIKV). Las proteínas molde se generaron a partir de secuencias mexicanas representativas para cada uno de los virus, usando el *Protein Data Bank* (PDB) (<https://www.rcsb.org/>), ubicando los péptidos seleccionados en tercera dimensión mediante el programa *Phymol v2.5*, para verificar su disposición expuesta en la superficie de la proteína. Además, se lograron identificar regiones compartidas que podrían ser propuestas para la identificación simultánea de ambos virus y de tamizaje para otros flavivirus de importancia en salud pública.

Para favorecer la inmunogenicidad al incrementar el peso molecular, los péptidos seleccionados *in silico*, serán sintetizados químicamente en formato de péptidos multiantigénicos de ocho ramificaciones (MAP8). El sistema de MAP es utilizado para mejorar la antigenicidad de las secuencias peptídicas, debido a su naturaleza multimérica. Esta alternativa permite superar la capacidad de unión de los péptidos a la superficie plana de la placa de microtitulación y aumenta la sensibilidad de la detección.

Los péptidos serán utilizados experimentalmente en laboratorio, bajo las condiciones establecidas para el ensayo inmunoenzimático de referencia internacional (MAC-ELISA). Para establecer las condiciones del ensayo, se tomarán en cuenta las siguientes variables: concentración de anticuerpo de captura, concentración de los péptidos (como fuente de antígeno), solución para dilución de sueros, conjugado, y bloqueo (leche descremada, albúmina bovina), factor de dilución de suero positivos y negativos para cada virus - se incluirán controles de tercera opinión - (como fuente de anticuerpos específicos), dilución del conjugado anti-péptido acoplado a peroxidasa, solución reveladora (ABTS y TMB), así como los tiempos de incubación de cada uno de los componentes de la prueba de diagnóstico. Se analizarán los resultados y bajo los criterios del Sistema de Gestión, se elegirán las mejores condiciones para la validación del desempeño del método, para posteriormente ser registrado como servicio de Diagnóstico y Referencia en el Centro Colaborador de la OPS/OMS en Arbovirus en el InDRE y ser transferido a la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública, para el Diagnóstico de Dengue y otras Arbovirosis, pertenecientes a la

Secretaría de Salud, México; a nivel internacional se pondrá a disposición de los Laboratorios Nacionales de la Región, bajo los criterios que establezca la Red de Laboratorios de Dengue y otras Arbovirosis de las Américas (RELDA - OPS/OMS), para la normalización del uso de metodologías avaladas para el Diagnóstico.

ESTRATEGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA LA GENERACIÓN DE HERRAMIENTAS DIAGNÓSTICAS Y TERAPÉUTICAS

Sandra Goñi / sandra.goni@unq.edu.ar

Mercedes Pastorini

Iara Scialfa

Maria José Lapponi

Leopoldo Gebhard

Ezequiel Ríos

Elena Britos

Agustín Gracia

Mario E. Lozano

Laboratorio de Virus Emergentes, Instituto de Microbiología Básica y Aplicada, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Argentina

Milagros Simari

Gabriel Iglesias

Juan Manuel Carballeda

Laboratorio de Virología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Hurlingham (UNAHUR)

La gran complejidad de enfermedades infecciosas cuyo origen etiológico es de naturaleza viral presenta un gran desafío en el campo de las técnicas diagnósticas. Desde el Laboratorio de Virus Emergentes trabajamos en diferentes líneas con el objeto de establecer un flujo de trabajo que converja en pruebas de diagnóstico para la identificación serológica y/o molecular de diferentes virosis de importancia local y regional.

En este sentido, durante la pandemia de SARS-CoV-2, los investigadores Gabriel Iglesias, Juan Manuel Carballeda y Leopoldo Gebhard optimizaron una metodología para el monitoreo de aguas residuales en barrios vulnerables del Área Metropolitana de Buenos Aires. En conjunto con diferentes organismos del estado se llevó adelante la implementación de este monitoreo con el objetivo principal de anticipar brotes de SARS-CoV-2, previendo así las estrategias de diagnóstico y abordaje en cada caso.

Durante la pandemia, Mercedes Pastorini, Iara Scialfa y Sandra Goñi formaron parte de la Unidad de Diagnóstico COVID-19, conformada en la Plataforma de Servicios Biotecnológicos (PSB) de nuestra Universidad. En este contexto, se articuló con el grupo de monitoreo de aguas residuales para llevar adelante la caracterización de las variantes, previo a su envío al proyecto PAIS (Proyecto Argentino Interinstitucional de genómica de SARS-CoV-2) para una secuenciación completa (Torres *et al.*, 2021). En este marco, se

logró implementar el uso de una combinación de oligonucleótidos que dió lugar a la caracterización temprana de la circulación de Omicron en la zona sur del AMBA.

Además, a través de la articulación con personal médico del Hospital Zonal General de Agudos “Dr. Isidoro Iriarte”, se realizó un análisis de la correlación entre valores de CT y perfil clínico pediátrico para COVID-19 en la ciudad de Quilmes (Brizuela *et al.*, 2022).

Además de los abordajes mencionados que se dieron lugar en la pandemia, y como mencionamos previamente, nuestro grupo de trabajo lleva adelante diferentes proyectos.

Diagnóstico serológico: expresión de proteínas recombinantes

En primer lugar es muy importante reconocer los antígenos relevantes del virus de interés. Además de emplear versiones completas de las secuencias de interés, es posible realizar análisis inmuno bioinformáticos para identificar los epítopes más importantes, abarcando diferentes versiones de proteínas recombinantes.

Actualmente en nuestro laboratorio, trabajamos con las proteínas no estructurales (NS, por non structural) números 1 y 5 para los flavivirus DENV, YFV, SLEV, WNV y ZIKV, contando además con la versión Ep-NS1_{SLEV}, que abarca únicamente epítopes de secuencia identificados como se indicó más arriba (Lorch *et al.*, 2019; Simari *et al.*, 2020). Este trabajo lo llevamos adelante en articulación con el grupo de Arbovirus del Instituto de Virología “Dr. J.M. Vanella” de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Córdoba y con el Instituto de Enfermedades Virales Humanas “Dr. Julio I. Maiztegui”, perteneciente a la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS-Malbrán).

A través de la articulación con el Servicio de Virosis congénitas del Instituto Malbrán, se inició un proyecto que tiene como objetivo expresar las proteína de la cápside del parvovirus humano B19, VP1, VP2 y VPu, con el objetivo central de contar con un método local que permita realizar el seguimiento de esta patología. Además, a través del desarrollo de una tesis de doctorado, se obtuvieron diferentes versiones de la proteína L1 del Virus del Papilloma Humano (HPV, por *Human Papilloma Virus*).

Mediante una pasantía realizada en el marco de la red temática de CYTED ViroRed (antecesora de la actual COVIRed), la Dra. Daria Elena Camacho de la Universidad de Carabobo, Venezuela, concurrió a nuestro laboratorio y logramos realizar el clonado, expresión y purificación de las versiones recombinantes de la proteína E2 de los virus Mayaro y Chikingunya.

Principalmente, empleamos sistemas bacterianos para producir las proteínas recombinantes, ya que apuntamos a métodos sencillos y de bajo costo. Además, tenemos amplia experiencia en el manejo de sistemas de expresión eucariotas, incluyendo el sistema baculoviral. Como parte de otra línea, se logró establecer un sistema de presentación de antígenos basado en la proteína Z de JUNV para células de mamíferos que puede ser utilizado de forma complementaria. Hasta este momento fue posible obtener proteínas recombinantes en sistemas bacterianos, fusionadas a una cola de histidinas (HT), con buenos niveles de expresión. Estamos trabajando en la optimización de la expresión y purificación de varios de ellos. Alternativamente, fusionamos la secuencia completa de NS1_{SLEV} a un sistema basado en la proteína Z del virus Junín, obteniendo VLPs que están siendo analizadas en su composición. La proteína HT-NS1_{SLEV} para inocular ratones y evaluar la respuesta humoral α -NS1_{SLEV}, e iniciar el protocolo de generación de anticuerpos monoclonales.

A través de colaboraciones con otros grupos, estamos trabajando en la producción de una proteína recombinante que permita desarrollar una cromatografía de afinidad que sustituya la adquisición comercial, abaratando los costes de producción.

Diagnóstico molecular: la búsqueda de nuevos blancos moleculares

El complejo escenario de enfermedades virales emergentes y reemergentes de las Américas, presenta el desafío de revisar y actualizar los métodos moleculares de detección. De esta forma, las redes temáticas de CYTED han proporcionado instancias sumamente ricas de intercambio en insumos para la implementación de métodos moleculares que permitieran detectar agentes etiológicos que aún no se encontraban circulando en determinadas regiones. Además, sin duda, este espacio ha permitido revisar y optimizar métodos ya existentes, o abrir posibilidades a la implementación de abordajes novedosos. Inicialmente, nuestro grupo trabajó tanto en métodos para detectar arenavirus (RT-PCR-RFLP) como en metodologías para caracterizar genéticamente la atenuación de la virulencia del virus Junín (Lozano *et al.*, 1997; Goñi *et al.*, 2010; Goñi *et al.*, 2011; Stephan *et al.*, 2013).

A través de una pasantía en el Instituto de Salud Carlos III, fue posible iniciar el desarrollo de PCRs en tiempo real para llevar adelante el diagnóstico diferencial de los alphavirus artrálgicos Mayaro y Chikungunya por un lado, así como lo de los causantes de la encefalitis equina del este (EEEV), del oeste (WEEV) y venezolana (VEEV) por el otro. En el marco de la introducción del virus Chikungunya en América en el año 2013, la implementación de un método molecular específico y sensible es de gran interés para los laboratorios de salud pública. Afortunadamente, hasta la actualidad no se ha registrado la diseminación del virus Mayaro, pero existen evidencias que indican que este virus podría adaptarse de forma eficiente a ser transmitido por el mosquito *Aedes aegypti* en zonas urbanas, complejizando aún más el mapa de situación de transmisión viral en nuestra región (Hotez and Murray, 2017). Es así que, ambas metodologías de múltiple RT-qPCR han sido optimizadas, evidenciando una elevada sensibilidad y especificidad. Actualmente, nos encontramos articulando con diferentes centros para llevar adelante la validación analítica de la técnica, empleando muestras de campo.

Por otro lado, a través de la participación de integrantes de nuestro grupo en la unidad COVID-19 de la PSB, se comenzaron a impulsar proyectos de investigación y desarrollo en articulación con instituciones estatales. Así, se iniciaron diálogos con el Instituto Provincial del Cáncer de la Provincia de Buenos Aires (IPC, PBA) y el Instituto Nacional del Cáncer (INC), del Ministerio de Salud de la Nación. A través de estas instancias, pudo identificarse la necesidad de contar con un método de desarrollo nacional para el tamizaje de los genotipos de alto riesgo del virus del papiloma humano (HPV, por *Human Papilloma Virus*). Actualmente, el gran costo que deviene de implementar el tamizaje temprano deriva en un alcance territorial escaso. Por ello, hemos obtenido dos subsidios para proponer un abordaje molecular a través del desarrollo de un método de qPCR que permita identificar diferencialmente a los 14 genotipos de alto riesgo.

Abordajes terapéuticos: la biotecnología como aliada de la innovación

El diagnóstico de diferentes patologías virales es muy relevante, así como lo es también conocer los mecanismos inmunológicos que se establecen en una infección, con el objetivo de desarrollar estrategias terapéuticas. La búsqueda de nuevas terapias contra

enfermedades virales es vital, ya que muchas de las patologías que actualmente causan epidemias y endemias en diferentes regiones, como en Sudamérica, no poseen tratamientos efectivos. Asimismo, en un contexto donde el cambio climático y las actividades humanas propician la emergencia de virus zoonóticos, la investigación y el desarrollo de estrategias y tratamientos para controlar los brotes es una prioridad, tal como lo establece la Unidad de Enfermedades Desatendidas, Tropicales y Transmitidas por Vectores, parte del Departamento de Prevención, Control y Eliminación de Enfermedades Transmisibles de la Organización Panamericana de la Salud (OPS, 2022).

En este sentido, una de las líneas de trabajo en nuestro laboratorio tiene como objetivo la caracterización de la respuesta inmune innata de neutrófilos y plaquetas ante la presencia de proteínas que aparecen tempranamente en la infección. Por ejemplo, la proteína NS1 es el blanco de estudio para los flavivirus de circulación regional como DENV, SLEV, WNV, YFV y ZKV. Hay evidencias que muestran que un proceso específico de los neutrófilos, conocido como netosis, está incrementado en casos de dengue severo, especialmente en los cuadros hemorrágicos. En particular, nuestras investigaciones apuntan hacia conocer los mecanismos y la cronología en la cual el proceso de netosis colabora o perjudica la resolución de la fase aguda de las enfermedades causadas por flavivirus. Posteriormente, nos proponemos evaluar drogas potencialmente inhibitorias para el mecanismo estudiado, en diferentes estadios de la enfermedad. Es interesante además, poder analizar la función de las plaquetas y su implicancia en la gravedad de los cuadros clínicos, ya que hay evidencias que demuestran que la liberación de vesículas extracelulares derivadas de plaquetas activadas por proteínas como NS1, aumentan la letalidad en cuadros de dengue. Teniendo en cuenta un enfoque biotecnológico, muchas proteínas virales presentan características relevantes para construir nuevos abordajes metodológicos. Con esta perspectiva hemos establecido un sistema de expresión basado en la proteína de matriz del virus Junín (Z) en cultivos celulares eucariotas, con el fin de obtener *virus-like particles* (VLPs), dando lugar a otra línea de investigación en nuestro laboratorio que implica el desarrollo de plataformas vehiculadoras de antígenos. Las VLPs son partículas de pequeño tamaño que imitan la conformación y composición de partículas virales viables, pero al carecer de genoma, no pueden infectar células ni replicar, lo que las hace muy seguras. En nuestro laboratorio hemos utilizado la plataforma de VLPs derivadas del virus Junín para el desarrollo de vacunas profilácticas, logrando caracterizar el sistema de expresión mediante la vehiculización de la proteína verde fluorescente (eGFP) en sus mecanismos inmunes tanto humorales como celulares en un modelo de ratón (Borio *et al.*, 2012; Pastorini *et al.*, manuscrito en preparación). Estas VLPs lograron generar una respuesta eficiente en ausencia de un adyuvante, por lo que las vías de administración de las partículas se amplían y permiten incluir pacientes de los grupos de riesgo. Otro punto positivo de la plataforma es que resulta versátil para el reemplazo de la proteína de interés a vehicular, ya que se genera mediante clonado molecular de un único plásmido bacteriano portando las secuencias necesarias para la expresión en células de mamíferos.

Aprovechando las características de las VLPs, se encuentra en curso una investigación que implica la vehiculización de superantígenos virales para el desarrollo de un posible tratamiento contra leucemias y linfomas, considerando una vacuna terapéutica. Los superantígenos son proteínas que interactúan con linfocitos T o B de una forma no convencional, causando activación específica diferencial de determinados clones linfocitarios y como consecuencia, induciendo apoptosis de los mismos. En este sentido, el proyecto plantea la posibilidad de reemplazar las actuales terapias contra leucemias y

linfomas que a pesar de su efectividad causan efectos secundarios a los pacientes a lo largo y posteriormente a los tratamientos.

Reflexiones finales

El desarrollo de herramientas a ser empleadas en métodos de diagnóstico serológicos o moleculares es un área de trabajo en crecimiento y de gran relevancia en nuestros países. La disponibilidad de estas herramientas en las instituciones de salud garantiza el acceso a un diagnóstico efectivo y eficaz, articulando directamente con los organismos que planifican políticas de salud pública.

En este contexto, no queremos dejar de destacar la gran importancia que representa la construcción de redes temáticas de trabajo. Se constituyen espacios interdisciplinarios, donde las miradas de cada perfil profesional enriquece los abordajes tecnológicos, ya que el éxito de los mismos no sólo dependerá de la técnica en sí misma, sino también de un conocimiento amplio de diferentes aspectos del proceso de infección, la respuesta inmunológica y los perfiles clínico de las enfermedades.

Bibliografía

- Borio, C. S., Bilen, M. F., Argüelles, M. H., Goñi, S. E., Iserte, J. A., Glikmann, G., & Lozano, M. E. (2012). Antigen vehiculation particles based on the Z protein of Junin virus. *BMC biotechnology*, 12, 80. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-12-80>
- Brizuela ME, Goñi SE, Cardama GA, Zinni MA, Castello AA, Sommese LM, Farina HG. Correlation of SARS-CoV-2 Viral Load and Clinical Evolution of Pediatric Patients in a General Hospital From Buenos Aires, Argentina. *Front Pediatr*. 2022 Jul 7;10:883395. doi: 10.3389/fped.2022.883395. PMID: 35874580; PMCID: PMC9301330.
- Goñi, Sandra Elizabeth; Iserte, Javier Alonso; Stephan, Betina Inés; Borio, Cristina Silvia; Ghiringhelli, Pablo Daniel; et al.; Molecular analysis of the virulence attenuation process in Junín virus vaccine genealogy; Springer; *Virus Genes*; 40; 3; 2-2010; 320-328
- Goñi SE, Stephan BI, Iserte JA, Contigiani MS, Lozano ME, Tenorio A. Viral diversity of Junín virus field strains. *Virus Res*. 2011 Sep;160(1-2):150-8. doi: 10.1016/j.virusres.2011.06.004. Epub 2011 Jun 13. PMID: 21689697.
- Hotez PJ, Murray KO (2017) Dengue, West Nile virus, chikungunya, Zika—and now Mayaro?. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 11(8): e0005462. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005462>
- Lorch MS, Collado MS, Argüelles MH, Rota RP, Spinsanti LI, Lozano ME, Goñi SE. Production of recombinant NS1 protein and its possible use in encephalitic flavivirus differential diagnosis. *Protein Expr Purif*. 2019 Jan;153:18-25. doi: 10.1016/j.pep.2018.08.008. Epub 2018 Aug 17. PMID: 30125621.
- Lozano ME, Posik DM, Albariño CG, Schujman G, Ghiringhelli PD, Calderón G, Sabattini M, Romanowski V. Characterization of arenaviruses using a family-specific primer set for RT-PCR amplification and RFLP analysis. Its potential use for detection of uncharacterized arenaviruses. *Virus Res*. 1997 May;49(1):79-89. doi: 10.1016/s0168-1702(97)01458-5. PMID: 9178499.
- Organización Panamericana de la Salud. Recomendaciones para la detección y el diagnóstico por laboratorio de infecciones por arbovirus en la Región de las Américas. Washington, D.C.; 2022. Disponible en: <https://doi.org/10.37774/9789275325872>.
- Simari MB, Goñi SE, Luppó VC, Fabbri CM, Argüelles MH, Lozano ME, Morales MA, Iglesias NG. Specific diagnostic method for St. Louis encephalitis virus using a non-structural protein as the antigen. *J Gen Virol*. 2020 Feb;101(2):168-174. doi: 10.1099/jgv.0.001359. Epub 2019 Dec 13. PMID: 31846411.
- Stephan, Betina Inés; Lozano, Mario Enrique; Goñi, Sandra Elizabeth; Watching every step of the way: junín virus attenuation markers in the vaccine lineage; Bentham Science Publishers; *Current Genomics*; 14; 7; 11-2013; 415-424
- Torres C, [Goñi SE], Viegas M. Cost-Effective Method to Perform SARS-CoV-2 Variant Surveillance: Detection of Alpha, Gamma, Lambda, Delta, Epsilon, and Zeta in Argentina. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Dec 10;8:755463. doi: 10.3389/fmed.2021.755463. PMID: 34957143; PMCID: PMC8703000.

LOS MURCIÉLAGOS COMO HOSPEDADORES VIRALES: UN ENFOQUE SISTÉMICO

Adriana Delfraro / adriana@fcien.edu.uy

Sandra Frabasile

Sección Virología, Departamento de Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay

Lucía Moreira Marrero

Germán Botto Núñez

Sección Virología, Departamento de Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Programa para la Conservación de los Murciélagos del Uruguay (PCMU), Uruguay

Los murciélagos (Orden *Chiroptera*) son mamíferos con amplia distribución, y constituyen el segundo orden en abundancia luego de los roedores, con 200 géneros y aproximadamente 1400 especies. Representan el 20% de todos los mamíferos conocidos (Teeling *et al.*, 2005). Poseen un conjunto de características particulares como la capacidad de migrar a grandes distancias, hábitos coloniales, son animales longevos, muestran altas tasas metabólicas relacionadas con el vuelo activo y poseen un sistema inmune tolerante a las infecciones. Tienen un rol crítico en los ecosistemas, contribuyendo a la dispersión de semillas, la polinización, el control de las poblaciones de insectos y regeneración de bosques.

Han sido implicados como los reservorios naturales y transmisores de la rabia, los Henipavirus, los Ebolavirus y un amplio rango de coronavirus, entre los que se destacan los virus del SARS (*Severe Acute Respiratory Syndrome*) y del MERS (*Middle East Respiratory Syndrome*).

En Uruguay habitan 22 especies de murciélagos. Todas pertenecen al Suborden Microchiroptera, y se dividen en tres familias: *Vespertilionidae*, *Molossidae* y *Phyllostomidae*. En cuanto a la dieta, la mayoría de los murciélagos del Uruguay son insectívoros, a lo que se suma una especie hematófaga (el vampiro *Desmodus rotundus*) y dos especies frugívoras (Botto Núñez *et al.*, 2019).

Los arbovirus (*arthropod-borne viruses*) son un conjunto de virus que se mantienen en la naturaleza a través de la transmisión biológica entre vectores artrópodos y vertebrados susceptibles. Entre los integrantes de las familias *Togaviridae* (género *Alfavirus*), *Flaviviridae* (género *Flavivirus*) y *Peribunyaviridae* (género *Orthobunyavirus*) encontramos un conjunto importante de arbovirus relevantes para la salud humana y la sanidad animal.

Los ciclos biológicos pueden ser más o menos complejos dependiendo del virus, involucrando diferentes vectores que actúan en ambientes urbanos o selváticos, o como vectores puente. Los hospedadores amplificadores pueden ser diversos vertebrados (aves, roedores, equinos, humanos). Para algunos alfavirus encefalíticos como los virus de la encefalitis equina del Oeste (WEEV) y del Este (EEEV) humanos y equinos no son

amplificadores virales eficientes, sino que actúan como hospedadores finales o terminales (Weaver, 2005).

En Uruguay, hay circulación documentada de alfavirus y flavivirus desde 1970 (Somma Moreira *et al.*, 1970). En esa misma década, el país experimentó una epizootia de WEEV, que abarcó también varias provincias argentinas (Acha and Szyfres, 2003). En 1997 se identifica la presencia de *Aedes aegypti* en el territorio iniciando así la vigilancia vectorial y virológica de DENV en Uruguay. En este marco, fue posible determinar la circulación del virus de la Encefalitis de San Luis (SLEV), con detecciones esporádicas hasta 2019. En 2009, se identifica un caso humano fatal por WEEV, no asociado a epizootias en equinos (Delfraro *et al.*, 2011).

Estos antecedentes llevaron a nuestro grupo a comenzar a investigar los potenciales vectores de estas arbovirosis en nuestro país, caracterizando las poblaciones y realizando detección de genoma viral en mosquitos. Por otro lado, se realizó la búsqueda de anticuerpos neutralizantes en equinos por PRNT, lo que nos permitió identificar evidencias de circulación de flavivirus (SLEV) y posiblemente virus *West Nile* (WNV), así como varios alfavirus: virus Rio Negro (RNV), virus de la encefalitis equina Venezolana (VEEV) subtipo IAB, virus Pixuna (PIXV) (todos pertenecientes al complejo VEEV) EEEV linaje I, virus Madariaga (MADV) y WEEV (Burgueño *et al.*, 2013, 2018).

En cuanto al rol de los murciélagos como posibles hospedadores de arbovirus, diversos autores han evidenciado su presencia en quirópteros, ya sea por detección genómica o por evidencias serológicas (Calisher *et al.*, 2006; Moratelli and Calisher, 2015; Fagre and Kading, 2019).

Considerando los antecedentes de la literatura, así como las evidencias de circulación de varios alfavirus en nuestro país, nos planteamos como objetivo iniciar su identificación y caracterización en murciélagos del Uruguay. Asimismo, continuamos con el monitoreo virológico en mosquitos, a fin de identificar posibles áreas de riesgo de transmisión, aportando al conocimiento de los ciclos naturales de estos agentes en la región.

En un período de nueve años (2013-2022) se capturaron y analizaron murciélagos provenientes de diversas localidades del país donde se habían identificado colonias, además de capturas realizadas a campo. Se realizaron campañas de muestreo en los departamentos de Montevideo, Canelones, Maldonado, Rocha, Lavalleja, Cerro Largo, Treinta y Tres, Artigas, Soriano y Rivera. Las capturas se realizaron mediante redes de niebla; luego de la identificación taxonómica de los individuos se tomaron muestras de hisopado bucal, utilizando RNAlater como medio de inactivación y conservación del ARN. Se analizaron un total de 273 muestras.

Para las colectas de mosquitos se utilizaron trampas de luz tipo CDC (modelo 512) cebadas con CO₂ u otros atrayentes (octenol, levadura). Las capturas abarcaron diversas localidades de los departamentos de Montevideo, Canelones, Rocha, Treinta y Tres, Cerro Largo, Rivera, Artigas, Salto, Paysandú, Rio Negro, Soriano y Colonia. Los individuos se identificaron bajo lupa y en placa fría utilizando las claves taxonómicas de Darsie (Darsie, Jr, 1985) y se agruparon en pools de hasta 50 individuos, separados por especie, sexo, hembras alimentadas, hembras no alimentadas. En el periodo 2009-2019 se analizaron un total de 5537 mosquitos agrupados en 436 pools.

Las muestras de hisopado bucal de murciélagos fueron sometidas a extracción de ARN total utilizando kits comerciales. Los pools de mosquitos se homogeneizaron con medio MEM, y luego de clarificarlos por centrifugación, se extrajo ARN total utilizando Trizol® o kits comerciales. La detección genómica de alfavirus se realizó utilizando una RT-PCR anidada o semianidada (Sánchez-Seco *et al.*, 2001), seguida de secuenciación Sanger y análisis

filogenético. Para las muestras positivas, se utilizaron además protocolos específicos para los diferentes virus (Bronzoni et al., 2004; Pisano et al., 2014).

Como resultado de los estudios en mosquitos, se identificaron varios pools positivos para RNV. Los mismos correspondieron a *Culex pipiens* capturados en la localidad de Las Toscas (depto. de Canelones) y *Anopheles spp* capturados en Rocha. En 2022 se identifica un pool positivo de *Aedes albifasciatus* proveniente de la localidad de Paso Pache (Florida).

También fue posible detectar EEEV linaje I en un pool de *Culex pipiens* capturados en la ciudad de Fray Bentos (depto. de Río Negro) y en un pool de *Anopheles spp* provenientes del depto. de Rocha.

Los primeros estudios en murciélagos, realizados en muestras del periodo 2013-2015 dieron como resultado el hallazgo de RNV en siete ejemplares de *Tadarida brasiliensis*, de los cuales seis pertenecían a la colonia de Usina Cuñapirú, ubicada en el depto. de Rivera y uno era parte de la colonia de Juan Pablo Terra (depto. de Artigas). El análisis filogenético mostró que estos virus estaban más emparentados con RNV identificados en las provincias de Chaco y Formosa (Argentina) a partir de aislamientos de mosquitos y roedores, y más divergentes de los RNV identificados previamente en Uruguay en *Cx. pipiens*.

Adicionalmente, se identificaron dos individuos del género *Myotis spp* positivos para EEEV linaje I, también pertenecientes a la colonia de Usina Cuñapirú. Los mismos se agrupan con secuencias de USA y de Colombia, y no están directamente relacionados a los EEEV detectados previamente en *Cx. pipiens* capturados en Fray Bentos (Moreira Marrero et al., 2022).

Los hallazgos más recientes de estos virus en murciélagos del Uruguay corresponden a muestreos 2017-2022 donde se analizó un total de 196 individuos. Se observó un aumento en la distribución geográfica de RNV, ya que se encontraron ejemplares positivos en Soriano, Montevideo, Rocha, Florida, Lavalleja y Maldonado. Se identificó RNV en nuevas especies de quirópteros: además de nuevos positivos en *T. brasiliensis*, el virus fue detectado en *Molossops temminckii*, *Molossus molossus*, *Myotis spp.*, *Eptesicus montanus* y *Eptesicus furinalis*. Se destaca la primera detección de este virus en una especie hematófaga: el vampiro *Desmodus rotundus*.

En cuanto a EEEV linaje I, es en general menos abundante, asociado fundamentalmente a *Myotis spp* y muestra una distribución restringida a la Usina Cuñapirú en Rivera. Recién en 2022 se encontró por primera vez un ejemplar de *Eumops bonariensis* positivo para EEEV, el cual fue capturado en la zona sur del país, en la localidad de Paso Pache (Florida).

Estos hallazgos sugieren que murciélagos de varias especies pueden tener un rol en el ciclo natural de estos alfavirus, sea como amplificadores virales o como hospedadores finales. RNV es el alfavirus más abundante y con más amplia distribución, como ya se pudo observar en nuestros trabajos previos sobre serología en caballos (Moreira Marrero, 2023).

EEEV linaje I, si bien se encuentra con menor frecuencia, se ha detectado a lo largo de este estudio en mosquitos y en murciélagos, indicando que este virus no es exclusivo de Norteamérica. Es importante mantener y ampliar su monitoreo, considerando que este virus puede provocar graves epizootias en caballos y brotes epidémicos en humanos con alta letalidad. Actualmente, se encuentran en marcha una serie de estudios que permitirán aproximarnos al conocimiento del rol de los quirópteros en los ciclos naturales de estos virus en Uruguay. Es necesario continuar con los muestreos de murciélagos y mosquitos, intensificando las capturas en regiones poco muestreadas e incluyendo el análisis de otros posibles hospedadores como las aves y los roedores, especialmente en regiones donde hay actividad de alfavirus. Se llevarán a cabo intentos de aislamiento a partir de sangre de murciélagos y homogeneizados de mosquitos, así como la búsqueda de anticuerpos

neutralizantes en sueros de murciélagos, Para la identificación de las presas de las que se alimentan, realizaremos el análisis de la comida sanguínea en mosquitos hembra alimentados, utilizando como marcador el citocromo B mitocondrial.

En noviembre-diciembre de 2023, se informa de un brote de encefalitis equina en Argentina y Uruguay. Los primeros casos fueron detectados en las provincias de Córdoba, Santa Fe y Corrientes, y en los departamentos de Salto y Paysandú en Uruguay. El agente identificado fue WEEV, un alfavirus que causó epizootias en 1980-1986 en Argentina, y un único caso humano en Uruguay en 2009. En USA, los últimos casos confirmados datan de 1994. Luego de su reemergencia, el virus se dispersó ampliamente en Argentina y abarcó la totalidad del territorio uruguayo, con la ocurrencia de casos humanos en ambos países.

<https://www.paho.org/es/documentos/evaluacion-riesgo-para-salud-publica-relacionada-con-virus-encefalitis-equina-oeste-eeo>

Este evento de emergencia viral está aún en desarrollo y se encuentran en marcha estudios virológicos, genómicos y de eco epidemiología, que se espera contribuyan a esclarecer el ciclo natural y el origen del brote en la región.

Financiación

ANII-FCE (FCE_1_2019_1_155570), Programa CSIC Grupos I+D, Udelar (C311-347)

Redes I+D

COVIREN-CYTED, Núcleo de Virología Molecular (AUGM)

Bibliografía

- Acha, P.N., and B. Szyfres, 2003: Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals: Chlamydioses, Rickettsioses and Viroses, 3rd edn. Washington D.C.: Organización Panamericana de la Salud.
- Botto Nuñez, G., E.M. González, and A.L. Rodales, 2019: Conservación de los murciélagos (Mammalia: Chiroptera) de Uruguay: estado actual y perspectivas. *Mastozoología Neotrop.* **26**, xx-xx, DOI: 10.31687/saremMN.19.26.1.0.05.
- Bronzoni, R.V.M., M.L. Moreli, A.C.R. Cruz, and L.T.M. Figueiredo, 2004: Multiplex nested PCR for Brazilian Alphavirus diagnosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **98**, 456-461.
- Burgueño, A., S. Frabasile, L.A. Díaz, A. Cabrera, M.B. Pisano, M.E. Rivarola, M. Contigiani, and A. Delfraro, 2018: Genomic characterization and seroprevalence studies on alphaviruses in Uruguay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **98**, 1811-1818, DOI: 10.4269/ajtmh.17-0980.
- Burgueño, A., L. Spinsanti, L.A. Díaz, M.E. Rivarola, J. Arbiza, M. Contigiani, and A. Delfraro, 2013: Seroprevalence of St. Louis encephalitis virus and West Nile virus (Flavivirus, Flaviviridae) in horses, Uruguay. *Biomed Res. Int.* 1-6, DOI: 10.1155/2013/582957.
- Calisher, C.H., J.E. Childs, H.E. Field, K. V Holmes, and T. Schountz, 2006: Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin Microbiol Rev* **19**, 531-545.
- Darsie, Jr, R., 1985: Mosquitoes of Argentina. Part I: Keys for identification of adult females and fourth stage larvae in english and spanish (Diptera, Culicidae). *Mosq. Syst.* **17**, 153-253.
- Delfraro, A., A. Burgueño, N. Morel, G. González, A. García, J. Morelli, W. Pérez, H. Chiparelli, and J. Arbiza, 2011: Fatal human case of western equine encephalitis, Uruguay. *Emerg. Infect. Dis.* **17**, 952-954.
- Fagre, A.C., and R.C. Kading, 2019: Can Bats Serve as Reservoirs for Arboviruses? *Viruses* **11**, 215, DOI: 10.3390/v11030215.
- Moratelli, R., and C.H. Calisher, 2015: Bats and zoonotic viruses: Can we confidently link bats with emerging deadly viruses? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **110**, 1-22, DOI: 10.1590/0074-02760150048.
- Moreira Marrero, L., 2023: Identificación y caracterización de Coronavirus y Alfavirus en murciélagos de Uruguay. PhD thesis, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.
- Moreira Marrero, L., G. Botto Nuñez, S. Frabasile, and A. Delfraro, 2022: Alphavirus Identification in Neotropical Bats. *Viruses* **14**, DOI: <https://doi.org/10.3390/v14020269>.
- Pisano, M.B., C. Torres, V.E. Ré, A.A. Farías, M.P. Sánchez Seco, A. Tenorio, R. Campos, and M.S. Contigiani, 2014: Genetic and evolutionary characterization of Venezuelan equine encephalitis virus isolates from Argentina. *Infect. Genet. Evol.* **26**, 72-9, DOI: 10.1016/j.meegid.2014.05.011.

- Sánchez-Seco, M.P., D. Rosario, E. Quiroz, G. Guzmán, and A. Tenorio, 2001: A generic nested-RT-PCR followed by sequencing for detection and identification of members of the alphavirus genus. *J. Virol. Methods* **95**, 153–161.
- Somma Moreira, R.E., J. Campione-Piccardo, J.C. Russi, M. Hortal de Giordano, C.A. Bauzá, G. Peluffo, and H.C. Tosi, 1970: Arbovirus en el Uruguay. *Arch. Pediatr. Urug.* **41**, 359–363.
- Teeling, E.C., M.S. Springer, O. Madsen, P. Bates, S.J. O'Brien, and W.J. Murphy, 2005: A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record. *Science* (80-.). **307**, 580–584, DOI: 10.1126/science.1105113.
- Weaver, S.C., 2005: Host range, amplification and arboviral disease emergence. *Arch Virol* **19**, 33–44.

SITUACIÓN ACTUAL Y PERSPECTIVAS DE HANTAVIRUS EN MÉXICO

Ana Laura Viguera Galván / ana.viguera09@gmail.com

Montserrat Elemí García Hernández

Erika Nallely Hernández Villegas

Rosa Elena Sarmiento Silva

Gerardo Suzán*

Laboratorio de Virología, Departamento de Microbiología e Inmunología; Unidad de Investigación en Ecosalud y Producción Pecuaria Sostenible, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México

International Joint Laboratory Ecosystem, biological diversity, habitat modifications, and risk of emerging pathogens and diseases in Mexico (ELDORADO), Instituto Francés de Investigación para el Desarrollo

*Departamento de Etología Fauna Silvestre y Animales de Laboratorio, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.

Los hantavirus pertenecen al género de los *Orthohantavirus*, son virus ARN trisegmentados, son zoonóticos, sus reservorios son roedores silvestres de la familia Muridae, se considera que su transmisión es directa, se han reportado estos virus en otros grupos taxonómicos como los quirópteros, soricomorfos y marsupiales, pero se desconoce su potencial como reservorios competentes. Estos virus están asociados a ambientes rurales donde algunas actividades humanas permiten la interacción indirecta entre los roedores y el humano, este virus se transmite al humano través del contacto con aerosoles de heces y orina de roedores infectados, entre los roedores la transmisión es directa mediante mordeduras o acicalamiento entre ellos.

La ecología de los hantavirus es un tema ampliamente abordado por la comunidad científica, ya que son buenos modelos de estudio para explorar y explicar los factores bióticos y abióticos relacionados al ciclo enzoótico de los hantavirus, la especificidad de reservorios, su filogeografía y evolución, así como también para probar la hipótesis del efecto de dilución y el riesgo de brotes epidémicos en las poblaciones vulnerables.

Estos virus son responsables de dos diferentes enfermedades que afectan al humano en el mundo, dependiendo de la distribución geográfica de sus reservorios. En Eurasia los reservorios de estos virus son roedores de la subfamilia *Murinae* y producen Fiebres Hemorrágicas con Síndrome Renal (FHSR), esta enfermedad fue descrita por primera vez en los años 50s durante la guerra de Corea, donde afectó a 3000 soldados aproximadamente y se asoció a un virus aislado de roedor, al cual se denominó Hantaan virus; actualmente este complejo de FHSR afectan aproximadamente a 30 mil personas al año y la mortalidad oscila entre el 0.1 al 15%, la forma más grave es la Nefropatía

epidémica. Los virus asociados a las FHSR son principalmente el Hantaan virus, Seoul Virus, Puumala, Dovraba y Saaremaa.

En América los principales reservorios de los hantavirus son los roedores de la familia Cricetidae (subfamilias *Arvicolinae*, *Neotominae* and *Sigmodontinae*), los hantavirus americanos producen el Síndrome Pulmonar por hantavirus (SPH), esta enfermedad fue reportada por primera vez a inicios de la década de los 90s en la región Navajo conocida como “Four Corners” en Estados Unidos de América. Se identificó a un hantavirus asociado a roedores de la especie *Peromyscus maniculatus*, a este hantavirus se le denominó Sin Nombre Virus (SNV); posteriormente a mediados de la misma década se detectaron los primeros casos de SPH en Suramérica, específicamente en Argentina el virus responsable en esta región del continente se denominó Andes virus. Actualmente el SPH en América tiene una mortalidad de hasta el 36%. Algunos de los virus principalmente asociados al SPH son SNV, Andes virus (ANDV), El Moro Canyon virus (ELMCV), Caño Delgadito (CDV), Catacamas virus (CATV), Choclo virus (CHOV) y Laguna negra virus (LANV), entre otros.

A finales de la década de los 2010s se reportaron dos eventos importantes en América, el primero entre los años 2016 y 2017 donde se reportó el ingreso del Seoul virus a Estados Unidos y Canadá a través de la importación de ratas con fines de mascotería, estas ratas fueron distribuidas en diferentes criaderos y tiendas de mascotas, alrededor de 11 se vieron afectadas por el Seoul virus quienes presentaron signos de enfermedad febril. El segundo evento importante fue en el 2019 en Argentina donde se reportó un brote de SPH en la provincia de Chubut en Argentina, en este evento epidémico se consideró la posibilidad de la transmisión humano-humano al identificar un 99.99% de similitud genética en todos los casos analizados de este brote, si bien hasta el momento no ha sido posible establecer con claridad la transmisión humano-humano es importante mantener la vigilancia del ANDV, ya que es uno de los hantavirus americanos más patogénicos.

En México hasta el momento no se han reportado casos de SPH, el país tiene condiciones ecológicas similares a las regiones del Suroeste de EUA y de Centroamérica, regiones donde sí hay casos de SPH, adicionalmente alberga una riqueza de 254 especies de roedores en su mayoría cricétidos. De acuerdo con la revisión sistemática que realizamos en el grupo de investigación, la cual fue publicada en el 2019, reportamos que en México existe evidencia de la amplia circulación de los hantavirus en los roedores con prevalencias variables entre los diferentes Estados del país, destacando que los estados de Hidalgo (>60%) y Chihuahua (>40%) son en los que se obtuvo la mayor prevalencia de hantavirus en las comunidades de roedores. Identificamos que existen dos estudios en humanos, donde se identificaron sueros humanos seropositivos a hantavirus en los estados de Chihuahua, Hidalgo, Ciudad de México, Colima y Guanajuato, mientras que en el Estado de Yucatán fueron negativos.

De acuerdo con la seroprevalencia por familia de roedores reportamos en cricétidos un 34.41% de seropositividad, en heterómidos el 34.01%, en súridos el 10.60% y en múridos el 10.43%. En este estudio se analizaron 82 especies de roedores de las cuales 43 se reportaron como seropositivas, las seroprevalencias oscilan entre el 3 y el 76%, los géneros en los que se identificaron a los individuos seropositivos fueron *Peromyscus*, *Reithrodontomys*, *Sigmodon*, *Oryzomys* y *Oligoryzomys*, los cuales son los géneros que albergan a las especies reservorio de los hantavirus americanos. Las especies seropositivas de los múridos son *Rattus* y *Mus* los cuales son identificados como reservorios de los hantavirus euroasiáticos.

Dentro de los reportes moleculares ha sido posible identificar 7 genotipos de hantavirus en 12 especies de roedores, destacan dos hantavirus zoonóticos el SNV y ELMCV, y el Limestone Canyon virus (LSV) el cual no se ha asociado a enfermedad; adicionalmente se han reportado al menos cuatro genotipos virales considerados endémicos para México, estrechamente relacionados con hantavirus patogénicos por lo que tienen potencial patogénico, Playa de Oro virus relacionado con CATV y Bayou virus; Montano virus, Carrizal virus y Huitzilac virus relacionados con ELMCV. En América se han reportado 41 especies de roedores como reservorios de hantavirus de las cuales 22 especies se distribuyen en México. De acuerdo con dicha distribución de especies es posible que al menos 16 genotipos de hantavirus americanos estén circulando en México de los cuales 9 son zoonóticos. De acuerdo con la diversidad viral de hantavirus que albergan las 41 especies de roedores en las que se ha identificado genoma viral de estos virus, en 12 de estas especies se han reportado hantavirus en México de las cuales cuatro de éstas albergan la mayor diversidad viral de hantavirus (*Oryzomys couesi*, *Reithrodontomys megalotis*, *Peromyscus maniculatus* y *Peromyscus leucopus*). Estas cuatro especies se encuentran ampliamente distribuidas en el país lo cual podría permitir la diversificación de los hantavirus, así como la posibilidad de brotes epidémicos en las poblaciones humanas.

Actualmente dentro de la Unidad de Investigación en Ecosalud y Producción pecuaria Sostenible ubicada en Mérida, Yucatán de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, a través del proyecto Diversidad Biológica Socioecosistemas y enfermedades virales emergentes en México, del PRONACES-Salud del Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), desarrollamos investigación con enfoque en Una Salud de manera multidisciplinaria. En este proyecto a través de un gradiente de uso de suelo y diferentes contextos socioculturales evaluamos los riesgos de emergencia de enfermedades virales. El proyecto tiene líneas de incidencia entre las que destacan, incidencia comunitaria y justicia social, incidencia en educación, incidencia en el sector salud, incidencia para la toma de decisiones e incidencia en políticas públicas que permitan la construcción de planes de acción y prevención para disminuir los riesgos a la salud y promover la salud ecosistémica.

Dentro de este proyecto uno de los grupos virales que analizamos son los hantavirus en roedores y murciélagos, hasta el momento hemos analizado muestras de 182 roedores de la península de Yucatán con una seroprevalencia del 14% en las especies *Peromyscus leucopus*, *Sigmodon toltecus*, *Ototylomys phyllotis*, *Heteromys desmarestianus* y *Heteromys gaumeri*. En cuanto a los análisis de secuenciación masiva realizados en muestras de murciélagos se detectó una representación del 14.4% de los hantavirus en la composición viral. Los hantavirus fueron detectados en las 8 especies analizadas (*Artibeus jamaicensis*, *A. lituratus*, *Carollia perspicillata*, *C. sowelli*, *Dermanura phaeotis*, *Glossophaga mutica*, *Molossus alvarezii* y *Sturnira parvidens*), aún falta profundizar en los análisis de bioinformática para determinar que hantavirus estamos detectando en estas especies. Estos resultados son preliminares y se continúan los análisis de laboratorio para determinar la presencia de genoma viral y anticuerpos contra hantavirus.

Todos estos resultados y el abordaje con enfoque de Una Salud ponen de manifiesto los retos y oportunidades frente a los hantavirus y su potencial emergencia en México, así como también el poco interés en la vigilancia de este grupo viral con lo que concluimos con cuatro puntos principales, los hantavirus han sido poco estudiados en México dentro de las poblaciones humanas aún cuando se ha demostrado su amplia distribución de hospederos y reservorios silvestres, el SPH es una enfermedad desatendida en México por la aparente

ausencia de casos, por lo que es importante reforzar la investigación y monitoreo sistemático en hospederos silvestres como la vigilancia epidemiológica en humanos de México, lo que es posible a través de las alianzas multidisciplinarias e interinstitucionales de los sectores científico y de salud pública, estrechando lazos con las poblaciones locales.

Fuentes de financiamiento

Esta investigación ha sido y se encuentra financiada por fuentes de financiamiento mexicanas, principalmente del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) con los proyectos, ciencia básica CB-179482, ciencia de frontera 2016-01-185 y PRONACES-Salud 303002, MEXUS-CONAHCYT CN-20-102, así como del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la UNAM, con los proyectos, IN225219 y AV200421

Artículo publicado vinculado

Vigueras-Galván AL, López-Pérez AM, García-Peña GE, Rico-Chávez O, Sarmiento-Silva RE, Suzán G. Current Situation and Perspectives on Hantaviruses in Mexico. *Viruses*. 2019 Jul 12;11(7):642. doi: 10.3390/v11070642. PMID: 31336858; PMCID: PMC6669582.

PRESENTACIÓN CLÍNICA POR SEROTIPO DE DENGUE EN UN ESTUDIO PEDIÁTRICO EN MANAGUA, 2004-2021

Ángel Balmaseda / abalmaseda@minsa.gob.ni

Departamento de Virología, Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia del Ministerio de Salud de Nicaragua, Nicaragua

El virus del Dengue, una amenaza a la salud mundial, consiste en cuatro serotipos (DENV1-4) que causan un espectro de manifestaciones clínicas desde cuadros leves a severos y potencialmente enfermedad fatal. Este estudio, basado en 19 años de información del Estudio de Cohorte de Dengue Pediátrico y los estudios llevados a cabo en el Hospital de Dengue Pediátrico en Managua, Nicaragua, investiga la influencia del serotipo y el estado inmunológico en la severidad del dengue. Los participantes del estudio fueron personas de 6 meses a 17 años de edad y se hizo seguimiento de su estadía en el hospital o como pacientes ambulatorios, considerando casos de dengue confirmados por métodos moleculares, serológicos y/o virológicos.

Se analizó una cohorte de un total de 14071 participantes, de los cuales 2954 (21%) fueron positivos para infección de DENV. Del total de casos positivos tras análisis de serotipo mediante RT-PCR se encontró que 541 se corresponden con DENV1, 996 a DENV2, 718 a DENV3 y 170 a DENV4. La enfermedad severa fue más prevalente dentro de los pacientes con DENV2 y DENV4 secundario, mientras que una severidad similar de la enfermedad fue observada en casos primarios y secundarios de casos de DENV1 y DENV3. De acuerdo con la clasificación desarrollada en 1997 por la Organización Mundial de la Salud (OMS), tanto DENV2 como DENV3 se asocian con una proporción mayor de enfermedad severa en comparación con otros serotipos, donde DENV3 se asoció con un mayor porcentaje de severidad considerando la clasificación de la OMS del año 2009. El DENV2 fue asociado con efusión pleural y un bajo recuento de plaquetas, mientras que DENV3 fue correlacionado con shock hipotensivo y compensado.

Estos resultados enfatizan la necesidad crítica para una vacuna contra el dengue con una eficacia balanceada para los cuatro serotipos, particularmente considerando que las vacunas existentes muestran una eficacia variable de acuerdo con el serotipo de dengue y el estado inmunológico de cada individuo. Este hecho representa un desafío para lograr la protección de determinados individuos, particularmente aquellos que no han transitado una infección con el virus del dengue.

Artículo publicado

José Victor Zambrana, Karla Gonzalez, Elsa Videa, Sonia Arguello, Fanny Barrios, Sergio Ojeda, Miguel Plazaola, Nery Sanchez, Daniel Camprubí-Ferrer, Guillermina Kuan, Gabriela Paz Bailey, Eva Harris, Angel Balmaseda. Dengue severity by serotype and immune status in 19 years of pediatric clinical studies in Nicaragua. doi: <https://doi.org/10.1101/2024.02.11.24302393>

SESIÓN VIGILANCIA GENÓMICA

Flor H. Pujol / fhpujol@gmail.com

Investigadora del Laboratorio de Virología Molecular, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Venezuela

Susana Revollo / susanarevollo@gmail.com

Investigadora del Instituto de Servicios, Laboratorios de Diagnóstico e Investigación en Salud (SELADIS), Universidad Mayor de San Andrés, Bolivia



Durante la evolución de un virus, la generación de mutaciones ocurre como un evento natural y frecuente durante su replicación. Algunas mutaciones específicas definen los grupos genéticos virales o variantes que circulan actualmente en todo el mundo. Aunque muchas de las mutaciones no tienen ningún impacto o consecuencia en el fenotipo viral, algunas pueden resultar en que el virus sea más transmisible, facilitar su escape a la respuesta inmunológica o aumentar su patogenicidad.

Las epidemias y pandemias virales han reforzado la importancia de las herramientas moleculares para el diagnóstico y control de enfermedades emergentes. La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR), ha representado una revolución en el campo biomédico y se ha convertido en una herramienta de rutina para el diagnóstico molecular de cualquier patógeno o enfermedad. La secuenciación genómica, particularmente la de última generación (*Next Generation Sequencing*, NGS por sus siglas en inglés), se ha vuelto igualmente el elemento indispensable para el manejo y caracterización de estas epidemias virales.

Con la pandemia de SARS-CoV-2 y la importancia de la vigilancia genómica para el monitoreo en tiempo real de la evolución de este virus, se puso de manifiesto las grandes diferencias entre países, en las capacidades técnicas para el abordaje genómico de estas epidemias. En particular, en el grupo que conforma la red de virología del Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED), en articulación con la Organización Panamericana de la Salud (OPS), la pandemia de SARS-CoV-2 significó para muchos países de la región un aprendizaje y fortalecimiento de las capacidades de vigilancia genómica para la secuenciación masiva de aislados virales, en el cual participó activamente además la OPS.

Desde la pandemia de SARS-CoV-2, la OMS ha emitido dos declaratorias de Emergencia Internacional de Importancia en Salud Pública en Mpox, enfermedad conocida anteriormente como viruela símica, causada por un poxvirus llamado actualmente MPXV. Igualmente, en este mismo período, ha surgido la emergencia por múltiples brotes de Influenza aviar H5N1 (clado 2.3.4.4b) en el mundo. Adicionalmente, se han solapado en el tiempo brotes epidémicos de las enfermedades ya endémicas en Latinoamérica, como por ejemplo el dengue. Esto hace que una discusión de vigilancia genómica en la red COVIRED fuese de gran relevancia en la reunión.

La Sesión de Vigilancia Genómica contó con 6 charlas.

-En primer lugar, la Dra. Leticia Franco (OPS, Panamá) nos presentó la "Estrategia y Redes de Vigilancia Genómica de la OPS (PAHOGen)".

-La Dra. Selene Zárate (Universidad Nacional Autónoma de México) explicó la "Implementación de la vigilancia genómica de influenza en México por el CoViGen-Mex".

-La Dra. Maria Paquita García Mendoza (Laboratorio de Referencia Nacional de Metaxénicas Virales del Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Perú) describió la "Detección del genotipo Cosmopolitan DENV-2".

- El Dr. Lucas Ripoll (Argentina) presentó el "Desarrollo de una plataforma para la detección y caracterización de virus transmitidos por *Aedes aegypti* mediante NGS".

- Finalmente, el Dr. Alexander Martínez (Panamá) abordó la "Vigilancia genómica del SARS-CoV-2 en Centroamérica".

Durante el desarrollo de las charlas se pudo apreciar cómo se fortaleció la región latinoamericana en vigilancia genómica. La versatilidad de estas técnicas permite que hayan sido adaptadas sobre la marcha a las emergencias que han surgido desde la pandemia, así como a otras enfermedades virales ya endémicas de la región latinoamericana.

ESTRATEGIA Y REDES DE VIGILANCIA GENÓMICA DE LA OPS (PAHOGen)

Leticia Franco / francolet@paho.org

**Oficial Técnico de diagnóstico y suministro de laboratorios, Unidad de manejo de riesgos infecciosos, Programa de emergencias en salud, Organización Panamericana de La Salud/
Organización Mundial de la Salud**

La caracterización genómica de patógenos emergentes con potencial epidémico y pandémico ha sido la base para desarrollar protocolos de diagnóstico molecular, vacunas y medicamentos. Además, esta estrategia también ha sido útil para complementar la vigilancia epidemiológica y para fortalecer la respuesta en salud pública para el control y la mitigación de epidemias y emergencias causadas por agentes infecciosos.

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) está trabajando para fortalecer la vigilancia genómica de patógenos emergentes a través de diferentes redes, no solo para extender la capacidad de secuenciación de laboratorio a nivel nacional y regional, sino también para generar información oportuna y datos de secuenciación genómica que alimenten los sistemas de vigilancia de diferentes patógenos o que permitan identificar de manera temprana señales de un nuevo patógeno.

En este contexto, diversas redes que utilizan la caracterización genómica como herramienta fundamental han sido coordinadas o co-lideradas por OPS en la región; por ejemplo, la Red PulseNet América Latina y el Caribe (PNALC), fue creada en 2003 con la visión de aportar, con nuevas tecnologías de laboratorio y el intercambio de información, a la integración de los datos regionales y para contribuir a la vigilancia global. Esta red se encarga de la caracterización molecular para la vigilancia regional de las enfermedades transmitidas por alimentos. PulseNet está conformada por 18 países de América Latina y la región del Caribe, y la OPS, y promueve la capacitación, el intercambio de conocimiento y el trabajo colaborativo entre los países miembros, con el fin de lograr los estándares de laboratorio vigentes en el plano internacional.

Por otro lado, en 2014, la OPS junto con los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos, CDC, y la Red de Laboratorios de Arbovirus de las Américas, RELDA, lanzaron el proyecto ViGenDA (Vigilancia Genómica del virus dengue en las Américas) con el objetivo de caracterizar los virus del dengue circulantes en la Región de las Américas y con esta base establecer una vigilancia genómica del dengue de manera sistemática y articulada con los sistemas de vigilancia integrados y los laboratorios de la RELDA. Herramientas para la vigilancia epidemiológica molecular de los genotipos de dengue en las Américas han sido desarrolladas e implementadas en varios países de la Región. Según el contexto epidemiológico actual de las arbovirosis en las Américas, desde 2018, ViGenDA fue ampliada como una plataforma de vigilancia genómica de Arbovirus endémicos y emergentes, incorporando además de dengue, también chikungunya, Zika, fiebre amarilla, entre otros.

Debido a todos los avances y logros que representa la publicación oportuna de información de secuencias genéticas en bases de datos abiertas, y el impacto que ha tenido para la respuesta de salud pública a la pandemia de COVID-19, la OPS en colaboración con los laboratorios de salud pública de los países de las Américas, implementó, en 2020, la Red Regional de Vigilancia Genómica de COVID-19 en la Región de las Américas (COVIGEN), una red para la secuenciación y vigilancia genómica del SARS-CoV-2. Esta iniciativa se basa en el fortalecimiento de los países de América Latina y el Caribe para generar y liberar datos de secuencia genómica y fortalecimiento de la vigilancia no solo de SARS-CoV-2, sino también de influenza y otros virus respiratorios.

Ante la necesidad de fortalecer la caracterización de mecanismos emergentes de resistencia a los antimicrobianos (RAM), así como conocer los patrones de diseminación de los mismos, tanto en seres humanos como con una perspectiva “Una Salud”, en el ambiente, animales terrestres y acuáticos, agricultura, la Red de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (RELAVRA+), establecida para el monitoreo y vigilancia de la RAM en Latinoamérica y el Caribe, está desarrollando e implementando líneas de acción específicas que permitan a los países el acceso a la caracterización genómica de los mecanismos de RAM.

Reconociendo todos los avances para descubrir, rastrear la evolución y patrones de dispersión, caracterizar nuevos linajes y variantes, y determinar las cadenas de transmisión de los agentes patógenos más allá de COVID-19, la OPS ha propuesto la “Estrategia de Vigilancia Genómica Regional para la preparación y respuesta a epidemias y pandemias”, que fue aprobada por los Estados Miembros en la 30ª Conferencia Sanitaria Panamericana en 2022. En este contexto, las redes regionales de vigilancia genómica de la OPS constituyen una fuerza regional, que conecta a los profesionales de laboratorios de toda la Región, clínicos, epidemiólogos, y demás actores de la preparación y respuesta en salud pública, ofreciendo a los países oportunidades de desarrollo capacidades que se extienden más allá de la generación y publicación de secuencias genómicas, puesto que además articula todos los componentes de la vigilancia para generar una verdadera vigilancia genómica que dé respuesta a las necesidades de la salud pública.

En este sentido, en 2022 la OPS progresó para consolidar los avances de las redes de vigilancia genómica de la OPS en la Región de las Américas, buscando estrategias de vigilancias genómica cada vez más integradas, para acelerar el intercambio de información y la integración de datos regionales, con la propuesta de PAHOGen, Redes de Vigilancia Genómica de la OPS, que funcionará como plataforma “paraguas” que engloba COVIGEN, VIGenDA, PulseNet, ReLAVRA+ y otras redes de genómica, para integrar los componentes de la vigilancia, mejorar la gestión de los recursos y capacidad instalada, y fortalecer de manera conjunta la capacidad regional de respuesta a emergencias.

IMPLEMENTACIÓN DE LA VIGILANCIA GENÓMICA DE INFLUENZA EN MÉXICO POR EL CoViGen-Mex

Selene Zárate / selene.zarate@uacm.edu.mx

Posgrado en Ciencias Genómicas. Universidad Autónoma de la Ciudad de México, México

Blanca Taboada

Rodrigo García-López

Carlos F. Arias Carlos

Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, México

José Esteban Muñoz-Medina

Coordinación de Calidad de Insumos y Laboratorios Especializados, Instituto Mexicano del Seguro Social, México

Joel Armando Vazquez-Perez

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, México

Alejandro Sanchez-Flores

Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, México

Rosa María Wong-Chew

Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas, División de Investigación, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México

El Consorcio Mexicano de vigilancia Genómica (CoViGen-Mex) se formó en 2021 con el objetivo de contribuir a la vigilancia genómica del virus SARS-CoV-2 en México, La colaboración de investigadores de distintas instituciones permitió conformar un grupo de trabajo multidisciplinario que facilitó la coordinación de recursos haciendo un sistema eficiente desde la recolección de muestras hasta los análisis evolutivos de este virus, abarcando los procesos de secuenciación . Al disminuir el número de casos de COVID-19 en 2023, el CoViGen-Mex se planteó incluir los virus respiratorios de Influenza y RSV dado el número limitado de datos de secuencias virales que existen en nuestro país de estos virus. Con la generación de esta información se pretende poder describir los patrones de circulación de dichos virus, puntos de entrada de nuevas variantes y generación de variantes virales en México, que sean útiles para el diseño de estrategias de control y prevención de enfermedades virales en nuestro país.

Vigilancia de influenza

Como punto de partida de esta nueva estrategia del CoViGen-Mex, se eligió al virus de influenza por su importancia clínica y epidemiológica. La influenza es una enfermedad viral respiratoria que puede causar síntomas graves y complicaciones, especialmente en grupos de alto riesgo como niños pequeños, ancianos y personas con sistemas inmunológicos comprometidos. Esta enfermedad es causada por dos grupos de virus, influenza A e influenza B. El virus de la influenza A es un virus con una alta tasa de evolución, lo que le permite evadir la respuesta inmune a través de un mecanismo conocido como deriva antigénica. Estos cambios pueden afectar la eficacia de las vacunas y tratamientos antivirales disponibles. La vigilancia genómica permite rastrear estas mutaciones y entender cómo están evolucionando las cepas del virus de la influenza.

Una de las principales razones por las que la vigilancia genómica de la influenza es importante es su papel en la selección de las cepas incluidas en las vacunas estacionales. Cada año, los expertos en salud pública revisan los datos de vigilancia genómica para identificar las cepas predominantes y predecir cuáles serán las más comunes en la próxima temporada de gripe. Esta información es crucial para garantizar que las vacunas sean efectivas y ofrezcan la mejor protección posible contra las cepas circulantes, y la generación de datos de México contribuirá en este respecto. Además de la selección de vacunas, la vigilancia genómica de la influenza también ayuda a detectar la aparición de cepas potencialmente peligrosas. Al monitorear los eventos de deriva y cambio antigénico se pueden identificar variantes que podrían tener un mayor potencial de propagación rápida o resistencia a los tratamientos antivirales disponibles. Esto permite una respuesta rápida y estratégica para contener la propagación de cepas peligrosas y desarrollar nuevas estrategias de tratamiento. Otro beneficio de la vigilancia genómica es su contribución a la comprensión de la epidemiología y la dinámica de la influenza. Al analizar la diversidad genética de los virus de la influenza y rastrear su evolución a lo largo del tiempo, los científicos pueden identificar patrones de transmisión, determinar cómo se propagan los virus entre las poblaciones y predecir la aparición de brotes estacionales o pandémicos. Además, la vigilancia genómica de la influenza es esencial para la preparación y respuesta ante una pandemia. Al monitorear de cerca los cambios genéticos en el virus y compartir datos a nivel mundial, los países pueden colaborar en la detección temprana de cepas pandémicas emergentes y coordinar una respuesta global para contener la propagación y minimizar el impacto en la salud pública.

En la base de datos GISAID (<https://gisaid.org/>, *Global Initiative on Sharing All Influenza Data*) están reportados 774 virus de influenza secuenciados de México de manera histórica, pero de los últimos 5 años solo hay 185. Además, si consideramos sólo aquellas secuencias sin pasajes en cultivo o en huevo no se alcanzan los 50 virus secuenciados en los últimos cinco años, por lo que podría incluir mutaciones de adaptación al cultivo que han sido reportadas previamente y que dificultan los análisis de evolución de estos virus. Finalmente, más del 80% de las secuencias disponibles corresponden a influenza de tipo A, por lo que la circulación de la influenza B en México está aún menos caracterizada. Todo esto resalta la importancia de aumentar el número de secuencias disponibles de alta calidad de estos virus en México.

El virus de la influenza pertenece a la familia *Orthomyxoviridae* y su genoma consta de ocho segmentos de RNA de una sola cadena con polaridad negativa. Los subtipos de influenza A se clasifican según sus proteínas de superficie, hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Hay 18 subtipos de HA y 11 de NA identificados en aves acuáticas, que son el reservorio

natural de este virus, la combinación de los subtipos de estas dos proteínas nos da la clasificación de los virus, aunque no todas las combinaciones se han observado en la naturaleza. Los subtipos de influenza A que circulan actualmente en la población humana son H1N1 y H3N2, junto con los dos subtipos de influenza B (Victoria y Yamagata). El diagnóstico de influenza se hace mediante RT-PCR e incluye el proceso de tipificación y subtipificación.

En este trabajo, se presenta una estrategia integral para la secuenciación del genoma completo de influenza, junto con el desarrollo de un flujo de trabajo bioinformático que facilite la asignación al subtipo correspondiente, el ensamble del genoma completo y la identificación de posibles coinfecciones. Las muestras son obtenidas de la red de hospitales y clínicas del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) con prueba positiva para influenza, con un valor de Ct menor a 28, con el fin de tener una concentración suficiente de material genético viral en la muestra para obtener la secuencia completa del virus. El RNA remanente de la prueba es retro transcrito y amplificado por PCR. En el caso de influenza A, se toma ventaja de que los extremos de todos sus segmentos virales están conservados, por lo que con un único par de oligonucleótidos se puede llevar a cabo el proceso de amplificación. En cambio, para influenza B es necesario utilizar oligonucleótidos específicos para cada uno de sus segmentos. Una vez que se ha amplificado el material genético viral, se lleva a cabo la segmentación, generación de librerías y la secuenciación masiva tipo pair end 2x150 en una plataforma Illumina.

Dado que el genoma de influenza está segmentado y que existen varias secuencias de referencia dependiendo el tipo y subtipo de influenza, se decidió implementar un flujo de trabajo que determinará automáticamente el subtipo de influenza presente en la muestra. Como una aproximación inicial, se usaron únicamente las secuencias de referencia de los virus que circulan normalmente en humanos, como A/H1N1, A/H3N2, B/Victoria y B/Yamagata. Para cada muestra, se llevó a cabo el mapeo contra cada uno de los genomas de referencia, y se eligió la mejor referencia con base en aquella que reclutaba un mayor número de lecturas. A partir de este mapeo 'ganador', se generó el genoma consenso y se realizó el llamado de variantes y finalmente se llevó a cabo el análisis de cobertura y profundidad.

En este trabajo, se seleccionaron un total de 482 muestras positivas para influenza por RT-PCR, obtenidas entre junio y diciembre de 2022. En esta selección, se trató de incluir estados de la República Mexicana con un número de muestras disponibles mayor a 10 con el fin de poder determinar la variabilidad de los virus circulantes; Se obtuvieron muestras provenientes de 13. Además, se incluyeron muestras de otros 4 estados que tenían menos de tres secuencias, pero que al no haberse podido subtipificar eran de interés epidemiológico. Del total de muestras, la secuenciación fue exitosa en 479 de ellas. En general, todos los segmentos del genoma fueron secuenciados con una profundidad mayor a 80. Sin embargo, en el caso de los genomas de H3N2, el segmento 2 tuvo una región con una cobertura menor a 10, y en el caso de H1N1, los segmentos 2 y 3 también presentaron este mismo problema.

De acuerdo con el diagnóstico por RT-PCR, se identificaron 437 muestras como correspondientes al subtipo H3N2, 17 como H1N1 y 25 muestras que no pudieron ser subtipificadas. Sin embargo, los resultados de su asignación por secuenciación fueron distintos en algunos casos. De las 17 muestras inicialmente asignadas como A/H1N1 por RT-PCR, 13 fueron posteriormente asignadas como A/H3N2 por secuenciación. Mientras

que siete muestras clasificadas como A/H3N2 por RT-PCR resultaron ser A/H1N1 en la secuenciación. Cabe mencionar que las 25 muestras inicialmente no subtipificadas por RT-PCR fueron asignadas como A/H3N2 en la secuenciación.

En este estudio, se logró obtener el genoma completo de los virus de influenza A circulantes en México durante la segunda mitad del año 2022. Sin embargo, se observó una baja profundidad en algunos fragmentos. Como perspectiva, se plantea el diseño de oligonucleótidos adicionales que permitan que mejoren la cobertura y profundidad de estos fragmentos. Dado que la amplificación resulta menos eficiente en fragmentos largos, esta estrategia podría mejorar los resultados..

Por otro lado, en varias muestras se encontró una discrepancia entre la subtipificación realizada por RT-PCR y la asignación mediante la secuenciación. En estos casos, se pretende realizar un análisis adicional para determinar si existe evidencia de coinfección que podría explicar la diferencia entre los resultados obtenidos. Finalmente, es importante destacar que el flujo de trabajo bioinformático será modificado para incluir otros subtipos de HA y NA con la finalidad de estar preparados ante la emergencia de otros subtipos de influenza.

Vigilancia del Virus Sincitial Respiratorio

Como siguiente objetivo del CoViGen-Mex se tiene el desarrollo de la secuenciación de otro virus respiratorio, el Virus Sincitial Respiratorio (VSR). El VSR es una de las principales causas de infecciones respiratorias agudas en lactantes y niños pequeños en todo el mundo. Se estima que casi todos los niños han sido infectados al menos una vez con el virus al momento de cumplir los dos años de edad. El VSR es una causa frecuente de hospitalización en lactantes y niños pequeños, especialmente en aquellos con enfermedades subyacentes, ya que puede provocar neumonía y bronquiolitis, siendo una de las principales razones de ingreso en unidades de cuidados intensivos pediátricos.

El VSR se clasifica en el género *Orthopneumovirus*, de la familia *Paramyxoviridae*. Dentro de este género existen dos tipos de VSR: el VSR tipo A (VSR-A) y el VSR tipo B (VSR-B). Ambos tipos de VSR son causantes de infecciones respiratorias en humanos, especialmente en lactantes y niños pequeños. Aunque comparten similitudes en su estructura y función, también pueden tener diferencias genéticas y epidemiológicas que afectan su prevalencia y patogenicidad. Esta clasificación ayuda a comprender mejor la diversidad y la evolución del virus, así como a orientar las estrategias de prevención y control de la enfermedad.

Recientemente, se ha desarrollado una vacuna contra RSV, por lo que iniciar la vigilancia genómica se vuelve primordial, ya que será necesario evaluar la generación de variantes virales de escape. Además, dado que este virus está menos caracterizado que el de Influenza, con sólo 7 secuencias de genomas completos de México en la BD de GISAID, es esencial impulsar la investigación en este campo.

Para iniciar con la vigilancia genómica de este virus, se desarrolló una estrategia con un proceso de amplificación con diez juegos de oligonucleótidos específicos. Se llevaron a cabo pruebas piloto con cuatro muestras, pero lamentablemente no se logró secuenciar el genoma completo. Solo se secuenciaron los primeros 11 mil nucleótidos, quedando 4 mil sin determinar. En ese sentido, se retomará el diseño de oligonucleótidos con el fin de obtener el genoma completo. Sin embargo, dado que el gen que codifica para la proteína G se

encuentra secuenciado, y es el utilizado para clasificar a VSR-A y VSR-B, la información obtenida hasta el momento es suficiente para hacer el seguimiento inicial de este virus.

Conclusiones

Los resultados obtenidos hasta este momento indican la viabilidad de obtener las secuencias completas de los genomas de dos de los patógenos respiratorios más importantes como lo son Influenza y RSV. Esto permitirá, por un lado, seguir los patrones de dispersión y diversidad de estos virus en México, pero además con la información de tres virus respiratorios, incluyendo a SARS-CoV-2 podremos describir cómo han cambiando los patrones de circulación de influenza y VSR después de la pandemia, así como el establecimiento del patrón estacional de SARS-CoV-2. La continuidad del trabajo de CoViGen-Mex permitirá seguir contribuyendo a la vigilancia genómica de virus importantes para la salud pública.

Financiamiento: Este proyecto fue parcialmente financiado por los proyectos CONAHCyT 303081 (RMWC) y 322631, C-812/2023 (C.F.A.). También recibió financiamiento del Programa UNAM-PAPIIT IN230523 (BT).

DETECCIÓN DEL GENOTIPO COSMOPOLITAN DE DENV-2

María Paquita García Mendoza / pgarcia@ins.gob.pe

Maribel Dana Figueroa Romero

Nancy Susy Merino Sarmiento

Adolfo Ismael Marcelo Ñique

Luis Gabriel De Lucio Burga

Laura Caico

Laboratorio de Referencia Nacional de Metaxénicas y Zoonosis, Instituto Nacional de Salud, Perú

Carlos Padilla Rojas

Henri Baylon

Laboratorio de Biología Molecular, Instituto Nacional de Salud, Perú

César Cabezas

Unidad de Intervenciones Estratégicas, Instituto Nacional de Salud, Perú

Introducción

El dengue representa un desafío creciente de salud pública en Perú y las Américas, con ciclos epidémicos cada 3 a 5 años ^{1,2,3}. Los cuatro serotipos del virus (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) han circulado desde 1990, y la propagación del vector *Aedes aegypti* ha exacerbado su incidencia, especialmente tras la disminución en actividades de control durante la pandemia de COVID-19. El aumento de la incidencia del dengue y la gravedad de la enfermedad puede estar asociada al cambio de los genotipos circulantes, así como a la evolución viral ^{1,4}. En el 2019, se identificó en Perú un nuevo genotipo del serotipo DENV-2, conocido como Cosmopolitan, tras un brote en Madre de Dios⁵. Este hallazgo subrayó la necesidad de fortalecer la vigilancia genómica para evaluar la dispersión de nuevos genotipos y su impacto en la salud pública, por lo que se secuenciaron virus de dengue procedentes de Ica, Lima y La Libertad en el Perú durante el año 2023.

Metodología

Se seleccionaron 61 muestras de suero de pacientes diagnosticados con dengue mediante RT-PCR, recolectadas entre mayo y junio de 2023 de las regiones Ica, Lima y La Libertad ubicadas en la costa del Perú. Los productos amplificados fueron procesados usando el Kit COVIDSeq-Ruo (Illumina) mediante secuenciación genómica de nueva generación (NGS), para luego cargarlos en el secuenciador genómico Miniseq (Illumina). Los genomas de las bases de datos y los secuenciados fueron alineados con el programa MAFFT. Estas fueron utilizadas para un análisis filogenético con la metodología de *Maximum Likelihood* (ML), para cada set de datos, con el programa IQTREE2 calculando el valor *bootstrap*.

Resultados

Se caracterizaron 55 genomas: 13 (23.6%) de DENV-1; y 39 (79.9%) de DENV-2 y 3 DENV3 (5,45%). Las muestras de DENV-1 corresponden al genotipo V, este genotipo circula desde los años 70s en el Caribe y las Américas. Las muestras de DENV-2 corresponden al genotipo Cosmopolitan, este genotipo fue detectado por primera vez en el Perú en 2019 (Madre de Dios) ⁵ y se ha dispersado a las diferentes regiones de Perú. Las muestras de DENV-3 corresponden al genotipo III, solo ha sido caracterizado en muestras de Lima metropolitana. Se reportan las mutaciones E:K343R y E:S338L para el serotipo DENV-1 en la región de la envoltura (Envelope, E). Se reportan las mutaciones E:L458F, E:I129V, E:I126T y E:V309A, E:V484I para el serotipo DENV-2 en la región de la envoltura (Envelope, E).

Conclusiones y Recomendaciones

Se identificaron y caracterizaron genomas de DENV-1, DENV-2 y DENV3 en Perú, destacando la presencia de mutaciones que podrían influir en la virulencia y propagación del virus. Se recomienda continuar con la vigilancia genómica y el análisis filogenético para monitorear el comportamiento de los serotipos y genotipos circulantes, así como evaluar si hay correlación con las presentaciones clínicas y gravedad.. Es crucial fortalecer las estrategias de control vectorial y la vigilancia de factores de riesgo para anticipar y mitigar futuros brotes.

Bibliografía

1. Cabezas C, Fiestas V, García-Mendoza M, Palomino M, Mamani E, Donaires F. Dengue en el Perú: a un cuarto de siglo de su reemergencia. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2015;32(1):146-56 Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v32n1/a21v32n1.pdf>
2. Ministerio de Salud. Sala de situación virtual, Dengue. [Internet] . Lima: Centro Nacional de Epidemiología y control de Enfermedades, MINSA; 2023 [Citado el 21 de AGOSTO 2023]. Disponible en: <https://www.dge.gob.pe/sala-situacional-dengue/>
3. Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud. Actualización Epidemiológica sobre dengue y otras arbovirosis. Washington, D.C. OPS/OMS. 2023
4. Nuñez, P.C.G.,Sampaio, S.A.F.,Rodrigues da Costa, N.,et al. Dengue severity associated with age and a new lineage of dengue virus-type 2 during an outbreak in Rio De Janeiro, Brazil. *Journal of Medical Virology* [Internet]. 2016 [citado el 5 de diciembre de 2019]; 88 (3):1130-1136. Disponible en:<https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-84962652965&origin=inward&txGid=7d6b13425bd844d60af7bb003a9eb5db>
5. García MP, Padilla C, et al . Emergence of the Cosmopolitan genotype of dengue virus serotype 2 (DENV2) in Madre de Dios, Peru, 2019. Emergencia del genotipo Cosmopolitan del virus dengue serotipo 2 (DENV2) en Madre de Dios, Perú, 2019. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2022;39(1):126-128. doi:10.17843/rpmesp.2022.391.10861

DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA PARA LA DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VIRUS TRANSMITIDOS POR *Aedes aegypti* MEDIANTE NGS

Lucas Ripoll / lripoll@uvq.edu.ar

Carolina Cerrudo

Damián Presti

Cristina Borio

Marcos Bilen

Área de Virus de Insectos, Laboratorio de Ingeniería Genética y Biología Celular y Molecular, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Argentina

Javier Iserte

Laboratorio de Bioinformática Estructural, Fundación Instituto Leloir, Argentina

María Paola Zago

Ramiro H. Poma

Unidad de Conocimiento Traslacional Hospitalaria, Hospital Público Materno Infantil de Salta (UCT-HPMI)-CONICET, Argentina

José Humberto Serrat / Mangione F / Micheloud G. / Gioria, V. / Berrón, C.

Programa de Zoonosis, Dirección General de Coordinación Epidemiológica, Ministerio de Salud Pública de Salta, Argentina

Introducción

En su discurso ante la Real Academia de Ciencias Médicas, Físicas y Naturales en La Habana, Cuba, en 1881, Carlos J. Finlay fue el primero en proponer la hipótesis de que la fiebre amarilla era transmitida por mosquitos [1]. Desde entonces, numerosas enfermedades con alto impacto en la salud humana han sido asociadas con la transmisión por mosquitos [2-3]. La proliferación de mosquitos en todo el mundo, particularmente del género *Aedes*, modulada por la actividad antropogénica y también impulsada por el cambio climático, convierte a los virus transmitidos por mosquitos en una importante amenaza para la salud pública [4-5].

El mosquito *Aedes aegypti* es el principal vector del Dengue (Serotipos 1-4 del DENV), Zika (ZIKV), Chikungunya (CHKV) y Fiebre Amarilla (YFV) [6]. Además, se ha establecido que los mosquitos sirven como hospedadores para un amplio espectro de arbovirus y virus específicos de insectos (ISVs), conocidos también como virus específicos de mosquitos (MSVs). Los MSVs infectan ya sea a los mosquitos o células derivadas de mosquitos. La identificación de los MSVs ha ampliado significativamente nuestra comprensión de la

diversidad viral y ha arrojado luz sobre las complejas interacciones entre estos virus cuando co-infectan a los mosquitos junto con los virus transmitidos por artrópodos (arbovirus) [7].

Los sistemas de *high throughput sequencing* (HTS) han influido significativamente en los estudios de viromas en diferentes nichos ecológicos u organismos particulares. La utilización generalizada de plataformas de secuenciación masiva económicas y fácilmente accesibles ha llevado a un aumento sustancial en los análisis de viromas en muestras de mosquitos en todo el mundo, centrándose especialmente en los virus de ARN [8-9]. Generalmente estos métodos se basan en el uso de *primers* aleatorios y la amplificación de secuencias virales en combinación con herramientas de HTS [9]. Estos enfoques sirven como herramientas valiosas para caracterizar el viroma del mosquito y han llevado al descubrimiento de una alta diversidad de MSVs [10-14].

Uno de los métodos ampliamente adoptados para enriquecer el genoma de ARN viral en pocas etapas es la *Sequence Independent Single Primer Amplification* (SISPA, por sus siglas en inglés) [15]. Esta técnica implica el uso de oligos aleatorios anclados a un *barcode* durante la retrotranscripción inicial de todo el ARN de una muestra. Posteriormente, se realiza una síntesis de la segunda cadena utilizando el mismo *primer* empleado en el primer paso. El resultado de estos dos pasos es una secuencia de ADN de doble cadena (dsDNA) desconocida flanqueada por una secuencia *barcode*. El tercer paso implica la amplificación completa de este producto utilizando el *barcode primer*. La secuenciación posterior de este producto y el análisis bioinformático de los datasets generados contribuyen a la detección viral o a la caracterización del viroma [16-19].

Este estudio tiene como objetivo implementar un método basado en SISPA acoplado secuenciación con el sistema Nanopore para monitorear la distribución de virus transmitidos por mosquitos, especialmente *Aedes aegypti*, en Argentina. El propósito principal es proporcionar información esencial para la prevención y el control de virus que tienen un impacto significativo tanto en la salud humana como animal, así como permitir la detección temprana de emergencias virales.

Materiales y métodos

Captura de muestras de mosquitos

Los mosquitos adultos de *Aedes aegypti* fueron capturados y clasificados morfológicamente entre diciembre de 2022 y mayo de 2023 en tres regiones distintas de Argentina. El conjunto inicial de muestras se obtuvo en el área metropolitana de Buenos Aires, específicamente en la ciudad de Quilmes. El segundo conjunto de muestras se recolectó en la provincia de Salta durante mayo de 2023, abarcando las ciudades de Las Lajitas, Galpón y Joaquín V. González. El tercer sitio de recolección fue la ciudad de Santa Fe en la provincia de Santa Fe. En la última ubicación, se recolectaron huevos de *Aedes* utilizando ovitrampas y posteriormente se criaron hasta la etapa adulta. En todos los casos, las muestras fueron clasificadas en grupos y conservadas en RNAprotect (PB-L, Argentina) para su transporte y almacenamiento.

Preparación de la biblioteca

Una vez obtenidas las muestras de mosquitos clasificadas se procedió al proceso de extracción de ácidos nucleicos y al armado de las bibliotecas para su secuenciación. El procesamiento de las muestras comprende el disgregado/ruptura de los pools de mosquitos y el tratamiento del sobrenadante de ruptura con RNasas y DNasas para eliminar el RNA y DNA propio del vector y obtener las partículas virales en suspensión. Luego se

procedió a la extracción de ARN viral utilizando fenol ácido. Se realizó la cuantificación y control de calidad de las extracciones de ARN mediante absorbancia 260, 260/280 y 260/230.

Con el ARN viral purificado se continuó con los pasos de retrotranscripción utilizando *primers* nonámeros anclados a un barcode y la síntesis de segunda hebra utilizando el mismo *primer*. Luego de estas etapas utilizando el *primer* barcode (propio de cada muestra) se realizó la amplificación del dsDNA de la muestra mediante la técnica *Sequence Independent Single Primer Amplification* (SISPA). Se controló el resultado del procedimiento mediante electroforesis en gel de agarosa y se cuantificó mediante Qubit 3.0.

Una vez obtenidas las bibliotecas se continuó con la secuenciación y procesamiento bioinformático. La secuenciación se llevó a cabo con el MinION Mk1b junto con las Flowcells R9.4.1 y los kits de ligación de adaptadores LSK-109.

Luego del proceso de secuenciación se procedió al análisis bioinformático de los resultados. Esto comprende varias etapas entre las que se encuentra el control de calidad de la secuenciación. La eliminación de secuencias de adaptadores y el demultiplexado basados en las secuencias de los *barcodes* utilizando Dorado (v. 0.3.4).

La identificación de lecturas relacionadas con virus se realizó mediante múltiples búsquedas BLASTN locales. Primero se realizó la búsqueda contra la base de datos completa no redundante de virus (nt_viruses). Luego, contra bases de datos de ARNr bacterianos y eucariotas (16S_ribosomal_RNA, 18S_fungal_sequences, 28S_fungal_sequence, ITS_eukaryotic_sequences, LSU_eukaryote_rRNA, LSU_prokaryote_rRNA). Finalmente, contra el genoma humano (GRCh38.p14). En todos los casos, se utilizó un valor de e-valor de corte de $1e^{-5}$.

Los hits en BLASTN que coincidían con la base de datos viral se filtran utilizando los resultados de los hits con las bases de datos de ARNr y humanas. Cuando un hit viral también coincide con estas últimas, se utilizó el valor de bit score de BLASTN para tomar una decisión. Cuando el valor de bit score del hit viral es mayor que la coincidencia con ARNr o humano, se incluyó la lectura; de lo contrario, se descartó. Las lecturas filtradas se dividieron por organismo según el TaxID de la especie objetivo.

Los hits virales se mapearon contra la referencia correspondiente utilizando Minimap2 (v. 2.24). Se generaron archivos BAM utilizando Samtools (v. 1.17). La cobertura en cada posición se calculó utilizando la herramienta de cobertura de Samtools (v. 1.17) y luego se generaron los histogramas de cobertura con SigmaPlot (v. 11.0). Las secuencias de consenso virales se obtuvieron a partir de los archivos BAM en formato FASTA utilizando Samtools (v. 1.17). En función de las secuencias virales rearmadas, se realizaron las inferencias filogenéticas correspondientes y se procedió al reporte de los hallazgos y a su referencia geográfica.

Resultados

Las lecturas resultantes de la secuenciación se clasificaron en un archivo “.FastQ” por localidad. Posteriormente, se realizó un filtrado utilizando BLASTN, y se obtuvo un archivo “.FastQ” por localidad que contenía únicamente los aciertos virales.

Genomas de virus parcialmente y completamente ensamblados

El mapeo de referencia utilizando los hits virales resultó en cobertura parcial en algunos casos y cobertura completa de virus en otros. Uno de los virus con mayor presencia en las muestras es el Phasi Charoen-like Phasivirus (PCLV), que se encontró y ensambló completamente en las tres regiones donde se capturaron mosquitos. *Aedes aegypti totivirus*

(AaTV) y *Aedes aegypti To virus 1* (AaToV1) se encontraron parcialmente en todas las muestras. *Aedes aegypti To virus 2* (AaToV2) solo se pudo ensamblar completamente en las provincias de Buenos Aires y Santa Fe, y solo una muestra mostró la presencia de regiones genómicas parciales del serotipo 2 del virus del dengue, de Las Lajitas en la provincia de Salta.

Se evaluó la profundidad y cobertura sobre los genomas de referencia en los virus completamente secuenciados. Los tres segmentos de PCLV se mapearon en las tres regiones (Salta, Buenos Aires y Santa Fe), cada uno mostrando una cobertura de secuencia >97%. Entre otros virus detectados, hemos mapeado y ensamblado completamente el Humaita Tubiacanga Virus (HTV), AaTV y AaToV2. Ambos segmentos de HTV fueron completamente secuenciados en la muestra de Quilmes y mostraron una cobertura superior al 97%. En el caso de AaTV, se mapeó y ensambló en la muestra perteneciente a Las Lajitas con una cobertura de secuencia superior al 99%.

AaToV2 se encontró en Quilmes y en la Ciudad de Santa Fe. Este virus se secuenció por primera vez en el estado de Tocantins en Brasil, y en este trabajo presentamos un nuevo genoma de Argentina completamente secuenciado y ensamblado con una cobertura superior al 98%.

Conclusiones

Este trabajo tuvo como objetivo caracterizar el viroma de mosquitos silvestres de Argentina utilizando tecnología de secuenciación HTS basada en nanopore sequencing. Para ello, se recolectaron mosquitos adultos y huevos durante el año 2022-2023 en diferentes regiones de Argentina (Salta, Buenos Aires y Santa Fe). Desarrollamos un esquema para procesar las muestras y seleccionar la fracción que contenía partículas virales y vesículas en desarrollo.

Para la amplificación del viroma de ARN, se implementó una metodología basada en SISPA. Posteriormente, se construyeron bibliotecas compatibles con la tecnología de secuenciación HTS de nanopore. Finalmente, los datos obtenidos se analizaron bioinformáticamente utilizando un pipeline construido ad hoc, basado en la identificación y el ensamblaje genómico utilizando bases de datos de referencia.

Los resultados obtenidos muestran la presencia de varios virus específicos de insectos. Particularmente en las muestras obtenidas del norte de Argentina, se encontraron AaTV y PCLV que pudieron ser completamente secuenciados, y AaToV1 y AaToV2 que fueron parcialmente secuenciados. En estas muestras, se detectó parcialmente una región genómica del serotipo 2 del virus del dengue. La muestra que contiene DENV-2 se obtuvo de una localidad con brotes de dengue reportados. Particularmente en la provincia de Salta, DENV 2 fue reportado como el serotipo circulante primario durante la 1^a y 14^a semana epidemiológica de 2023.

Por otro lado, las muestras recolectadas en Buenos Aires contienen la secuencia completa de HTV, AaTo2 y PCLV. El análisis filogenético indica que son virus estrechamente relacionados con los reportados en Brasil. Las muestras de Santa Fe correspondientes a mosquitos adultos obtenidos de huevos recolectados durante 2022 presentan la secuencia completa de los virus PCLV y AaToV2. Su presencia podría indicar un mecanismo de transmisión vertical, ya que estos son especímenes adultos criados en laboratorio, que se obtuvieron a partir de la eclosión de huevos recolectados usando ovitrampas. Además, se detectó el genoma completo de AaToV2 en ambas muestras recolectadas de Buenos Aires y Santa Fe; mientras que AaToV1 se detectó en las cinco muestras analizadas, pero solo se

obtuvieron secuencias parciales del genoma. Además, según nuestro conocimiento, este es el primer informe de AaToV1 y AaToV2 en mosquitos de Argentina; mientras que estos dos virus solo se han informado previamente en Brasil.

El análisis bioinformático comprendió pasos de filtrado exhaustivos que incluyeron BLASTN contra varias bases de datos de genes ribosomales. Esto fue necesario porque se encontraron varias lecturas con homología a una única región genómica específica del virus y a algunas secuencias genómicas ribosomales. Esto indica que el procedimiento utilizado para extraer y purificar el ARN viral debe ser más exhaustivo al agotar el ARN circulante. Posteriormente, los datos se filtraron con la base de datos del genoma humano, ya que se encontraron varias lecturas con genes homólogos de estos organismos.

La metodología presentada fue muy útil y práctica para monitorear el viroma de mosquitos. Puede ser utilizado rutinariamente para contar con herramientas de detección temprana o para la caracterización de arbovirus de interés para la salud. El monitoreo periódico utilizando herramientas basadas en NGS para la vigilancia entomológica es importante. Esto puede ser una herramienta útil no solo para detectar virus que tienen un alto impacto en la salud humana y animal, sino también para detectar virus específicos de insectos que promueven la transmisión de arbovirus.

Bibliografía

- [1] Finlay C. J. (2012). The Mosquito Hypothetically Considered as the Transmitting Agent of Yellow Fever. *MEDICC review*, 14(1), 56–59. <https://doi.org/10.37757/MR2012V14.N1.10>
- [2] Weaver, S. C., Charlier, C., Vasilakis, N., & Lecuit, M. (2018). Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. *Annual review of medicine*, 69, 395–408. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-050715-105122>
- [3] Chala, B., & Hamde, F. (2021). Emerging and Re-emerging Vector-Borne Infectious Diseases and the Challenges for Control: A Review. *Frontiers in public health*, 9, 715759. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.715759>
- [4] Kraemer, M. U. G., Reiner, R. C., Jr, Brady, O. J., Messina, J. P., Gilbert, M., Pigott, D. M., Yi, D., Johnson, K., Earl, L., Marczak, L. B., Shirude, S., Davis Weaver, N., Bisanzio, D., Perkins, T. A., Lai, S., Lu, X., Jones, P., Coelho, G. E., Carvalho, R. G., Van Bortel, W., ... Golding, N. (2019). Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Nature microbiology*, 4(5), 854–863. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0376-y>
- [5] Robert, M. A., Stewart-Ibarra, A. M., & Estallo, E. L. (2020). Climate change and viral emergence: evidence from *Aedes*-borne arboviruses. *Current opinion in virology*, 40, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2020.05.001>
- [6] Souza-Neto, J. A., Powell, J. R., & Bonizzoni, M. (2019). *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 67, 191–209. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.11.009>
- [7] Agboli, E., Leggewie, M., Altinli, M., & Schnettler, E. (2019). Mosquito-Specific Viruses-Transmission and Interaction. *Viruses*, 11(9), 873. <https://doi.org/10.3390/v11090873>
- [8] Hobson-Peters, J., Yam, A. W., Lu, J. W., Setoh, Y. X., May, F. J., Kurucz, N., Walsh, S., Prow, N. A., Davis, S. S., Weir, R., Melville, L., Hunt, N., Webb, R. I., Blitvich, B. J., Whelan, P., & Hall, R. A. (2013). A new insect-specific flavivirus from northern Australia suppresses replication of West Nile virus and Murray Valley encephalitis virus in co-infected mosquito cells. *PloS one*, 8(2), e56534. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056534>
- [9] de Almeida, J. P., Aguiar, E. R., Armache, J. N., Olmo, R. P., & Marques, J. T. (2021). The virome of vector mosquitoes. *Current opinion in virology*, 49, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.04.002>
- [10] Kumar, A., Murthy, S., & Kapoor, A. (2017). Evolution of selective-sequencing approaches for virus discovery and virome analysis. *Virus research*, 239, 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.06.005>
- [11] Zakrzewski, M., Rašić, G., Darbro, J., Krause, L., Poo, Y. S., Filipović, I., Parry, R., Asgari, S., Devine, G., & Suhrbier, A. (2018). Mapping the virome in wild-caught *Aedes aegypti* from Cairns and Bangkok. *Scientific reports*, 8(1), 4690. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22945-y>

- [12] Xiao, P., Li, C., Zhang, Y., Han, J., Guo, X., Xie, L., Tian, M., Li, Y., Wang, M., Liu, H., Ren, J., Zhou, H., Lu, H., & Jin, N. (2018). Metagenomic Sequencing From Mosquitoes in China Reveals a Variety of Insect and Human Viruses. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 364. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00364>
- [13] Thannesberger, J., Rascovan, N., Eisenmann, A., Klymiuk, I., Zित्रा, C., Fuehrer, H. P., Scantlebury-Manning, T., Gittens-St Hilaire, M., Austin, S., Landis, R. C., & Steininger, C. (2020). Highly Sensitive Virome Characterization of *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* Complex from Central Europe and the Caribbean Reveals Potential for Interspecies Viral Transmission. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 9(9), 686. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090686>
- [14] Thannesberger, J., Rascovan, N., Eisenmann, A., Klymiuk, I., Zित्रा, C., Fuehrer, H. P., Scantlebury-Manning, T., Gittens-St Hilaire, M., Austin, S., Landis, R. C., & Steininger, C. (2021). Viral metagenomics reveals the presence of novel Zika virus variants in *Aedes* mosquitoes from Barbados. *Parasites & vectors*, 14(1), 343. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04840-0>
- [15] Langat, S. K., Kerich, G., Cinkovich, S., Johnson, J., Ambale, J., Yalwala, S., Opot, B., Garges, E., Ojwang, E., & Eyase, F. (2023). Genome sequences of Phasi Charoen-like phasivirus and Fako virus from *Aedes aegypti* mosquitoes collected in coastal Kenya. *Microbiology resource announcements*, 12(11), e0067823. <https://doi.org/10.1128/MRA.00678-23>
- [16] Reyes, G. R., & Kim, J. P. (1991). Sequence-independent, single-primer amplification (SISPA) of complex DNA populations. *Molecular and cellular probes*, 5(6), 473–481. [https://doi.org/10.1016/s0890-8508\(05\)80020-9](https://doi.org/10.1016/s0890-8508(05)80020-9)
- [17] Chrzastek, K., Lee, D. H., Smith, D., Sharma, P., Suarez, D. L., Pantin-Jackwood, M., & Kapczynski, D. R. (2017). Use of Sequence-Independent, Single-Primer-Amplification (SISPA) for rapid detection, identification, and characterization of avian RNA viruses. *Virology*, 509, 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.06.019>
- [18] Chrzastek, K., Tennakoon, C., Bialy, D., Freimanis, G., Flannery, J., & Shelton, H. (2022). A random priming amplification method for whole genome sequencing of SARS-CoV-2 virus. *BMC genomics*, 23(1), 406. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08563-z>
- [19] Marcacci, M., De Luca, E., Zaccaria, G., Di Tommaso, M., Mangone, I., Aste, G., Savini, G., Boari, A., & Lorusso, A. (2016). Genome characterization of feline morbillivirus from Italy. *Journal of virological methods*, 234, 160–163. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.05.002>

VIGILANCIA GENÓMICA DEL SARS-CoV-2 EN CENTROAMÉRICA

Alexander Martínez / almartinez@gorgas.gob.pa

Claudia M. Gonzalez V.

Oris Chavarria

Ambar Moreno

Jessica Gondola

Departamento de Investigación en Genómica y Proteómica, Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, Panamá

La pandemia de SARS-CoV-2 llegó a Centroamérica entre los meses de febrero y marzo del 2020. Desde la óptica de los laboratorios nacionales de salud pública (LNSP) de la región estos meses se enfocaron en tener listos los métodos de detección de este nuevo patógeno, sin embargo, hay evidencia de que para la segunda semana de febrero ya existía circulación del virus en la región¹.

La mayoría de los LNSP, no contaban con protocolos o sistemas establecidos para la vigilancia genómica activa de los cambios acumulados en el virus. Esta fue establecida hasta finales del año 2020 en muchos países.

Se publicaron en GISAID por parte de Centroamérica pocos genomas completos de SARS-CoV-2, en los primeros meses de la pandemia, esto evidenció la necesidad de establecer un marco de laboratorio que permitiera formar una red de trabajo, para incrementar el acceso a los datos genómicos y mejorar la capacidad instalada en los laboratorios de referencia de la región. Estas instituciones durante la pandemia fueron las responsables de realizar el diagnóstico molecular, por lo tanto, estaban en capacidad y tenían acceso a las muestras o hisopados nasofaríngeos, insumos necesarios para llevar adelante la secuenciación de SARS-CoV-2.

Esta necesidad fomentó la creación de la red COVIGEN por parte de la OPS², cuyos objetivos se enfocaron en fortalecer la capacidad local de laboratorios de la región Centroamericana y brindar datos genómicos de SARS-CoV-2 de manera oportuna en bases de datos internacionales disponibles, colocando a la región en el mapa mundial, y evitando de esta forma, esa oscuridad geográfica que existió en los primeros meses de la pandemia. COVIGEN se enmarcó en el trabajo colaborativo entre los laboratorios de salud pública de los países miembros, en donde aquellos países con capacidad local de secuenciación participaron como laboratorios de referencia de secuenciación, realizando esta actividad para aquellos países que no tenían la capacidad instalada, y que fueron luego fortalecidos con equipamientos y entrenamiento personalizados, para asegurar la adecuada realización de la metodología y el uso de los datos obtenidos.

Con esta colaboración se lograron aportar 26580 genomas de SARS-CoV-2 que brindaron información relevante para la toma de decisiones en la región.

Reportes realizados con los datos generados, y analizados por los propios laboratorios de referencia, mostraron la aparición de linajes locales en Costa Rica³, la introducción temprana y críptica del SARS-CoV-2 en Panamá¹, la confirmación de casos de reinfección con linajes locales⁴ y la co-infección con virus localmente endémicos⁵. Todos estos datos

permitieron entender como el SARS-CoV-2 fue cambiando durante cada ola de transmisión en la región y ayudar a definir medidas apropiadas de control.

Luego de tres años de vigilancia, hacia finales del 2023, la región todavía tiene retos importantes; se observa que la sostenibilidad de la actividad pudo lograrse en Costa Rica, Guatemala, República Dominicana y Panamá, en estos países se siguió secuenciando y depositando información en GISAID, sin embargo, Belice, Honduras, Nicaragua, y El Salvador, tienen secuencias disponibles de manera esporádica en el último semestre del 2023.

Un estudio realizado con secuencias depositadas en GISAID desde febrero de 2020, hasta marzo de 2022⁶, mostró que la mayoría los países de la región secuenciaron menos del 3% del total de casos reportados durante ese periodo. Sin embargo, este número permitió dibujar patrones de distribución de SARS-CoV-2 entre Sur y Centroamérica. El surgimiento de las variantes Gamma, Lambda, Mu, estuvo caracterizada por periodos intensos de introducciones de virus (viral inflow) entre Colombia y Venezuela conectando Suramérica con Centroamérica y el Caribe. Desde las Antillas menores, Venezuela jugó un papel temprano en la diseminación de Gamma, posiblemente asociado con el origen amazónico de esta variante. En cambio, Colombia fue el origen de los linajes Lambda circulantes.

De la misma forma la variante Mu, primera vez descrita en Colombia, se propagó más ágilmente, hacia el Norte como destino final desde su origen. Sin embargo, rutas importantes de transmisión vinieron de Argentina y Chile, sobre todo hacia las islas de Caribe y México. También se observaron intensos periodos de introducción y reintroducción entre países vecinos en el Sur. Lo que evidencia lo difícil de cortar cadenas de transmisión entre fronteras porosas en países vecinos.

En cambio, Centroamérica fue notablemente afectada por la introducción de la variante Delta durante el año 2021, reflejando patrones de dispersión entre el caribe y el istmo de la región, seguido por una posterior dispersión hacia los centros urbanos de los países.

En la actualidad la infraestructura desarrollada para secuenciar SARS-CoV-2 está disponible para evaluar nuevos patógenos o mejorar la vigilancia genómica de aquellos patógenos endémicos en nuestra región. Es urgente la necesidad de incentivar la incorporación de este tipo de vigilancia, en virus transmitidos por vectores de importancia en nuestra región. A su vez la implementación en virus respiratorios como Influenza A y B, Virus Respiratorio Sincitial, permitirá una mejor elección del grupo de virus incluidos en las vacunas destinadas para nuestra región. En pocos años veremos la incorporación de estas vigilancias, en tableros de información disponibles para la toma de decisiones por parte de los ministerios de salud de los países de nuestra región.

De estos tres años podemos concluir que el sistema de vigilancia llevado adelante por los laboratorios nacionales de los países de la región se ha fortalecido, permitiendo a través de esta crisis, potenciar su rol en la vigilancia de patógenos. Esto en corto y mediano plazo, brindará un beneficio directo a la población en general, a través de la implementación de medidas razonadas y dirigidas hacia los segmentos de la población realmente afectada por los patógenos circulantes en un determinado momento.

Financiamiento

Grant 019911.006 Ministry of Economy, Sistema Nacional de Investigación SNI.

Redes COVIGEN

Bibliografía

1. Franco D, Gonzalez C, Abrego LE, Carrera JP, Diaz Y, Caicedo Y, et al. Early Transmission Dynamics, Spread, and Genomic Characterization of SARS-CoV-2 in Panama. *Emerg Infect Dis*. 2021 Feb;27(2):612–5.
2. Leite JA, Vicari A, Perez E, Siqueira M, Resende P, Motta FC, et al. Implementation of a COVID-19 genomic surveillance regional network for Latin America and Caribbean region. *PLoS One*. 2022;17(3):e0252526.
3. Molina-Mora JA, Cordero-Laurent E, Godínez A, Calderón-Osorno M, Brenes H, Soto-Garita C, et al. SARS-CoV-2 genomic surveillance in Costa Rica: Evidence of a divergent population and an increased detection of a spike T1117I mutation. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2021;92:104872. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134821001696>
4. Díaz Y, Ortiz A, Weeden A, Castillo D, González C, Moreno B, et al. SARS-CoV-2 reinfection with a virus harboring mutation in the Spike and the Nucleocapsid proteins in Panama. Vol. 108, *International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2021. p. 588–91.
5. Hesse S, Nuñez H, Salazar JR, Salinas TP, Barrera E, Chong R, et al. Case Report: First Confirmed Case of Coinfection of SARS-CoV-2 With Choclo orthohantavirus. *Front Trop Dis* [Internet]. 2021 Nov 10;2(November):1–9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/ftd.2021.769330/full>
6. Gräf T, Martinez AA, Bello G, Dellicour S, Lemey P, Colizza V, et al. Dispersion patterns of SARS-CoV-2 variants Gamma, Lambda and Mu in Latin America and the Caribbean. *Nat Commun* [Internet]. 2024 Feb 28;15(1):1837. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-024-46143-9>

Con el avance de la ciencia y la tecnología, las herramientas de detección y caracterización de patógenos de importancia en salud pública han evolucionado rápidamente, y la caracterización viral no es una excepción. El pasar de metodologías que mostraban características fenotípicas de los virus y tomaban varios días de ejecución a metodologías moleculares con resultados en solo horas ha permitido avanzar en el estudio y caracterización de los diferentes virus, así mismo ha posicionado al laboratorio como una herramienta básica en el diagnóstico e investigación virológica.

El desarrollo e implementación de metodologías como la reacción en cadena de la polimerasa y la secuenciación genética y genómica, permiten dar resultados de laboratorio precisos y oportunos que pueden ser utilizados en una amplia variedad de contextos y se convierten además en herramientas sumamente útiles para enfrentar las amenazas causadas por virus y proteger la salud global. Sin dejar de lado que, metodologías como el cultivo viral siguen siendo importantes según el contexto o aplicación.

Los nuevos conocimientos en virología e inmunología junto al desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico y caracterización viral permiten entre otras cosas:

- Identificar y clasificar nuevos virus
- Comprender los mecanismos biológicos que los virus utilizan para replicarse, infectar células y evadir el sistema inmunitario del huésped
- Desarrollar estrategias terapéuticas y vacunas efectivas, así como la detección de genes de resistencia a antivirales
- Vigilar y controlar brotes y epidemias
- Detectar genotipos de virus asociados con un alto riesgo carcinogénico
- Detectar variantes virales emergentes, evaluar su impacto en la transmisión y la virulencia, y ajustar las estrategias de prevención y tratamiento
- Contribuir a los estudios epidemiológicos al ofrecer datos precisos sobre la circulación de diferentes cepas y variantes virales en diversas poblaciones
- Rastrear mutaciones y recombinaciones que pueden influir en la adaptabilidad y patogenicidad de los virus

El rápido desarrollo de la tecnología y su aplicación en virología supone retos importantes para el laboratorio como la necesidad de contar con capacidad instalada de manera oportuna, cumpliendo con el equipamiento y la normativa de bioseguridad aplicable. A nivel de capacitación del recurso humano, se suma el requerimiento de integrar la bioinformática y el modelado computacional a los esquemas de trabajo para sacarle el mayor provecho al desarrollo tecnológico que experimentamos.

Finalmente, una vez implementadas las metodologías, el siguiente reto es lograr su sostenibilidad para que se conviertan en una actividad de rutina según las necesidades de diagnóstico, confirmación diagnóstica o vigilancia a las que deba responder el laboratorio.

A lo largo de esta sesión, contaremos con resúmenes de integrantes del InDRE (México) que recorren la *“Caracterización molecular de patógenos de importancia en salud pública”*, por parte de José Ernesto Ramírez González, el *“Estudio de los genotipos del virus del papiloma humano (VPH) prevalentes en lesiones cervicales en la población Mexicana”*, Noé Escobar Escamilla, y la experiencia de la *“Visita a laboratorios del Departamento de Biología Molecular y Validación de Técnicas. COVID-19, retos y experiencias”*, compartida por Eréndira Molina Gómez. Por último, contaremos con el resumen *“Un nuevo enfoque para identificar SARS- CoV-2 basado en Múltiple RT-PCR y electroforesis capilar”*, de Susana Revollo de Bolivia.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PATÓGENOS DE IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA

José Ernesto Ramírez González / ernesto.ramirez@salud.gob.mx

Responsable de la Unidad de Investigación Molecular y Desarrollo Tecnológico y apoyo del Departamento de Biología Molecular, Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), Dirección General de Epidemiología (DGE), México

El DNA y el RNA son las moléculas de interés involucradas en la caracterización genética y genómica de diferentes patógenos de importancia en la salud pública. Los eventos científicos más representativos en el estudio de estas moléculas fueron su caracterización en 1953 por James Watson y Francis Crick, su secuenciación por Frederick Sanger en 1977 y la reacción en cadena de la polimerasa por Kary Mullis en 1986, desde entonces se han implementado una serie de herramientas moleculares para el diagnóstico y la caracterización de agentes patógenos en México y en todo el mundo. Entre 1995 al 2000 se realizó la implementación a nivel nacional del diagnóstico y caracterización de Rotavirus (1, 2), entre 2000-2008 se implementó la secuenciación de Sanger en el InDRE como una herramienta de caracterización genética de varios patógenos como Sarampión, Varicela, Dengue, Influenza, (3, 4, 5, 6, 7). En 2009-2010, durante la pandemia de Influenza H1N1pdm que se presentó en nuestro país, se participó activamente en el diagnóstico y caracterización de este virus, realizando la secuenciación genética y genómica de los virus de Influenza; esto último con la finalidad de contribuir con información genética a la OMS para la toma de decisiones en la elaboración de los componentes de la vacuna de influenza, además de monitorear genéticamente la resistencia antiviral a Oseltamivir (8, 9, 10). Entre 2011 y 2019, se realizó la cartilización genómica de *Vibrio cholerae* durante la epidemia de este agente bacteriano en nuestro país en 2013 (11, 12) y de los virus Zika y Chikungunya durante las emergencias en salud por la introducción de estos virus al país (13, 14, 15, 16).

Durante la pandemia de SARS-CoV-2, la cual inició en nuestro país con la introducción del primer caso en febrero 2020 (17), el Departamento de Biología Molecular, participó en la coordinación técnica para la Preparación del InDRE ante la Pandemia COVID-19, colaborando en la estandarización de métodos internos y también en los propuestos por la OMS y en la capacitación a especialistas de nueve países de la región de Centroamérica y el Caribe en el diagnóstico por laboratorio del nuevo coronavirus (18) así como también en la transferencia de estas metodologías a la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública en México. Con la finalidad de abordar la Pandemia provocada por el Virus SARS-Cov-2 en el InDRE, se conformó un Comando de Incidentes para la atención de COVID-19, donde se coordinaron directamente las siguientes actividades:

- a) Diagnóstico de más de 600,000 muestras que ingresaron al InDRE, control de calidad y referencia del diagnóstico realizado en la RNLSP
- b) Coordinación de la Gestión de insumos y equipo para el diagnóstico realizado en la RNLSP diagnóstico a una gran parte de la población de nuestro país
- c) Evaluación comparativa de más de 200 estuches comerciales de RT-PCR y detección de Antígenos para el diagnóstico del SARS-CoV-2 (18), de los cuales aquellos que resultaron

útiles para el diagnóstico se publicaron en la página oficial del InDRE para su libre consulta, haciendo una aportación importante para la salud pública de nuestro país.

d) Vigilancia Genómica y análisis de la distribución de variantes de SARS-CoV-2, donde el InDRE contribuyó con la obtención de casi 20,000 genomas completos y realizó la vigilancia de variantes de más de 95,000 genomas depositados en GISAID por parte de México (20, 21, 22, 23, 24), contribuyendo así con información relevante. En colaboración con OPS, en octubre de 2022 se realizó un taller para el fortalecimiento en México de la Vigilancia Genómica. (25)

e) Coordinar y evaluar la Bioseguridad en todas las actividades del InDRE, diagnóstico y monitoreo del personal que participó directamente en la contingencia por COVID-19

Ante la emergencia en salud derivada de la introducción de mpox a nuestro país en mayo de 2022, se coordinó la integración de un grupo multidisciplinario para atender dicha emergencia desde la perspectiva del laboratorio. Con la experiencia y el crédito obtenido durante la Pandemia de COVID-19, se abordó la atención de este brote de una forma semejante, esto fue mediante la Preparación del InDRE ante la introducción de Viruela Símica a nuestro país, se realizó la estandarización de métodos internos y los propuestos por la OPS, en la capacitación a especialistas países de la región de Centroamérica y el Caribe en el diagnóstico por laboratorio del mpox (26) así como también en la transferencia de estas metodologías algunos laboratorio de la RNLSR con la finalidad de conformar una Red Regional de diagnóstico por laboratorio de mpox en Nuestro País. Al momento se han procesado más de 6500 muestras y se ha contribuido con información oportuna tanto a los pacientes como al sistema de salud en nuestro país.

Finalmente, en noviembre de 2022, el IDRE participó en la coordinación para la atención al brote Binacional de meningitis por hongos en los estados de Durango y Tamaulipas, colaborando directamente en la confirmación por laboratorio de un cultivo de *Fusarium solani*, así como en la estandarización y transferencia de diagnóstico molecular por laboratorio de *F. solani*. Se establecieron comunicaciones y colaboraciones internacionales (27) en el abordaje de la caracterización genómica del hongo para su diferenciación de especie.

Se ha participado y colaborado de manera Internacional en proyectos donde la línea científica es principalmente es la identificación y caracterización genética y genómica de patógenos de importancia en salud pública, entre otras instituciones, con la Universidad de Oxford (28), con Scripps Research Institute (29), OPS (30, 31), entre otros.

El InDRE cuenta con personal reconocido por del Sistema Nacional de Investigadores del CONACYT y pertenece a diferentes redes internacionales como: la Red de Laboratorios del grupo de acción para la seguridad global (Global Health Security Action Group, GHSAG), Red latinoamericana de PulseNet (International Molecular Subtyping Network for Foodborne Disease Surveillance), la Red de Laboratorios de Respuesta del CDC (LRN: Laboratory Response Network), Laboratorio Nacional de Referencia COVID19 ante la OMS y de la Red Regional de Vigilancia Genómica se SARS-CoV-2 en las Américas entre otras

Bibliografía

1. Rodríguez Castillo, A., Villa, A. V., Ramírez González, J. E., Mayén Pimentel, E., Melo Munguía, M., Díaz De Jesús, B., Olivera Díaz, H., & García Lozano, H. (2000). VP4 and VP7 genotyping by reverse transcription-PCR of human rotavirus in Mexican children with acute diarrhea. *Journal of clinical microbiology*, 38(10), 3876–3878. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.10.3876-3878.2000>
2. Rodríguez-Castillo, A., Ramírez-González, J. E., Padilla-Noriega, L., & Barrón, B. L. (2006). Analysis of human rotavirus G1P[8] strains by RFLP reveals higher genetic drift in the VP7 than the VP4 gene during a 4-year period in Mexico. *Journal of virological methods*, 138(1-2), 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.08.013>
3. Rodríguez-Castillo, A., Vaughan, G., Ramírez-González, J. E., González-Durán, E., Gudiño-Rosales, J. C., & Escobar-Gutiérrez, A. (2009). Genetic variation of Varicella-Zoster Virus strains circulating in Mexico City. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 46(4), 349–353. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2009.09.004>
4. Rodríguez-Castillo, A., Vaughan, G., Ramírez-González, J. E., & Escobar-Gutiérrez, A. (2010). Simultaneous cocirculation of both European varicella-zoster virus genotypes (E1 and E2) in Mexico city. *Journal of clinical microbiology*, 48(5), 1712–1715. <https://doi.org/10.1128/JCM.00112-10>
5. Rivera-Osorio, P., Vaughan, G., Ramírez-González, J. E., Fonseca-Coronado, S., Ruíz-Tovar, K., Cruz-Rivera, M. Y., Ruíz-Pacheco, J. A., Vázquez-Pichardo, M., Carpio-Pedroza, J. C., Cázares, F., & Escobar-Gutiérrez, A. (2011). Molecular epidemiology of autochthonous dengue virus strains circulating in Mexico. *Journal of clinical microbiology*, 49(9), 3370–3374. <https://doi.org/10.1128/JCM.00950-11>
6. Román-Pedroza, J. F., Cruz-Ramírez, E., Landín-Martínez, K. E., Salas-García, M., López-Ortiz, E., Ramírez-González, J. E., López-Martínez, I., & Díaz-Quiñonez, J. A. (2019). Diagnostic algorithm for the confirmation of cases of measles and rubella in Mexico. *Gaceta medica de Mexico*, 155(5), 492–495. <https://doi.org/10.24875/GMM.M20000337>
7. Lopez-Martinez, I., Balish, A., Barrera-Badillo, G., Jones, J., Nuñez-García, T. E., Jang, Y., Aparicio-Antonio, R., Azziz-Baumgartner, E., Belser, J. A., Ramirez-Gonzalez, J. E., Pedersen, J. C., Ortiz-Alcantara, J., Gonzalez-Duran, E., Shu, B., Emery, S. L., Poh, M. K., Reyes-Teran, G., Vazquez-Perez, J. A., Avila-Rios, S., Uyeki, T., ... Diaz-Quiñonez, J. A. (2013). Highly pathogenic avian influenza A(H7N3) virus in poultry workers, Mexico, 2012. *Emerging infectious diseases*, 19(9), 1531–1534. <https://doi.org/10.3201/eid1909.130087>
8. Ramirez-Gonzalez, J. E., Gonzalez-Duran, E., Alcantara-Perez, P., Wong-Arambula, C., Olivera-Diaz, H., Cortez-Ortiz, I., Barrera-Badillo, G., Nguyen, H., Gubareva, L., Lopez-Martinez, I., Diaz-Quiñonez, J. A., Lezana-Fernández, M. A., Gatell-Ramírez, H. L., Cordova Villalobos, J. A., Hernández-Avila, M., & Alpuche-Aranda, C. (2011). Oseltamivir-resistant pandemic (H1N1) 2009 virus, Mexico. *Emerging infectious diseases*, 17(2), 283–286. <https://doi.org/10.3201/eid1702.100897>
9. Rodriguez-Noriega E, Gonzalez-Diaz E, Morfin-Otero R, Gomez-Abundis GF, Briseño-Ramirez J, Perez-Gomez HR, Lopez-Gatell H, Alpuche-Aranda CM, Ramirez E, López I, Iguale M, Bojórquez Chapela I, Palacios Zavala E, Hernández M, Stuart TL, Villarino ME, Widdowson MA, Waterman S, Uyeki T, Azziz-Baumgartner E; Hospital Civil de Guadalajara, Fray Antonio Alcalde Emerging Respiratory Infections Response Team. Hospital triage system for adult patients using an influenza-like illness scoring system during the 2009 pandemic--Mexico. *PLoS One*. 2010 May 14;5(5):e10658. doi: 10.1371/journal.pone.0010658. PubMed PMID: 20498718; PubMed Central PMCID: PMC2871038.
10. Vazquez-Perez, J. A., Isa, P., Kobasa, D., Ormsby, C. E., Ramírez-Gonzalez, J. E., Romero-Rodríguez, D. P., Ranadheera, C., Li, Y., Bastien, N., Embury-Hyatt, C., González-Duran, E., Barrera-Badillo, G., Ablanedo-Terrazas, Y., Sevilla-Reyes, E. E., Escalera-Zamudio, M., Cobián-Güemes, A. G., Lopez, I., Ortiz-Alcántara, J., Alpuche-Aranda, C., Perez-Padilla, J. R., ... Reyes-Terán, G. (2013). A (H1N1) pdm09 HA D222 variants associated with severity and mortality in patients during a second wave in Mexico. *Virology journal*, 10, 41. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-41>
11. Díaz-Quiñonez, J. A., Hernández-Monroy, I., López-Martínez, I., Ortiz-Alcántara, J., González-Durán, E., Ruiz-Matus, C., Kuri-Morales, P., & Ramírez-González, J. E. (2014). Genome Sequence of *Vibrio cholerae* Strain O1 Ogawa El Tor, Isolated in Mexico, 2013. *Genome announcements*, 2(5), e01123-14. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01123-14>
12. Díaz-Quiñonez, J. A., Hernández-Monroy, I., Montes-Colima, N. A., Moreno-Pérez, M. A., Galicia-Nicolás, A. G., López-Martínez, I., Ruiz-Matus, C., Kuri-Morales, P., Ortiz-Alcántara, J. M., Garcés-Ayala, F., & Ramírez-González, J. E. (2016). Biochemical and full genome sequence analyses of clinical *Vibrio cholerae* isolates in Mexico reveals the presence of novel *V. cholerae* strains. *Microbes and infection*, 18(5), 322–328. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.01.004>

13. Díaz-Quifonez, J. A., Ortiz-Alcántara, J., Fragoso-Fonseca, D. E., Garcés-Ayala, F., Escobar-Escamilla, N., Vázquez-Pichardo, M., Núñez-León, A., Torres-Rodríguez, M.deL., Torres-Longoria, B., López-Martínez, I., Ruiz-Matus, C., Kuri-Morales, P., & Ramírez-González, J. E. (2015). Complete genome sequences of chikungunya virus strains isolated in Mexico: first detection of imported and autochthonous cases. *Genome announcements*, 3(3), e00300-15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00300-15>
14. Díaz-Quifonez, J. A., Escobar-Escamilla, N., Ortiz-Alcántara, J., Vázquez-Pichardo, M., de la Luz Torres-Rodríguez, M., Nuñez-León, A., Torres-Longoria, B., López-Martínez, I., Ruiz-Matus, C., Kuri-Morales, P., & Ramírez-González, J. E. (2016). Identification of Asian genotype of chikungunya virus isolated in Mexico. *Virus genes*, 52(1), 127–129. <https://doi.org/10.1007/s11262-015-1275-9>
15. Díaz-Quifonez, J. A., Escobar-Escamilla, N., Wong-Arámbula, C., Vázquez-Pichardo, M., Torres-Longoria, B., López-Martínez, I., Ruiz-Matus, C., Kuri-Morales, P., & Ramírez-González, J. E. (2016). Asian Genotype Zika Virus Detected in Traveler Returning to Mexico from Colombia, October 2015. *Emerging infectious diseases*, 22(5), 937–939. <https://doi.org/10.3201/eid2205.160190>
16. Díaz-Quifonez, J. A., López-Martínez, I., Torres-Longoria, B., Vázquez-Pichardo, M., Cruz-Ramírez, E., Ramírez-González, J. E., Ruiz-Matus, C., & Kuri-Morales, P. (2016). Evidence of the presence of the Zika virus in Mexico since early 2015. *Virus genes*, 52(6), 855–857. <https://doi.org/10.1007/s11262-016-1384-0>
17. La OPS y el InDRE de la Secretaría de Salud de México capacitarán a especialistas de nueve países en diagnóstico por laboratorio del nuevo coronavirus. <https://www.paho.org/es/noticias/11-2-2020-ops-indre-secretaria-salud-mexico-capacitaran-especialistas-nueve-paises>
18. Garcés-Ayala, F., Araiza-Rodríguez, A., Mendieta-Condado, E., Rodríguez-Maldonado, A. P., Wong-Arámbula, C., Landa-Flores, M., Del Mazo-López, J. C., González-Villa, M., Escobar-Escamilla, N., Fragoso-Fonseca, D. E., Esteban-Valencia, M. D. C., Lloret-Sánchez, L., Arellano-Suarez, D. S., Nuñez-García, T. E., Contreras-González, N. B., Cruz-Ortiz, N., Ruiz-López, A., Fierro-Valdez, M. Á., Regalado-Santiago, D., Martínez-Velázquez, N., ... Ramírez-González, J. E. (2020). Full genome sequence of the first SARS-CoV-2 detected in Mexico. *Archives of virology*, 165(9), 2095–2098. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04695-3>
19. Gómez PC, Guzmán BC, Gordillo MM, Ramírez GJE, Hernández RL, López MI et al. Identificación de pruebas comerciales de PCR útiles para detectar virus SARSCoV-2 en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos durante el primer año de pandemia de COVID-19 en México. *Rev CONAMED*. 2022; 27(2): 68-79. <https://dx.doi.org/10.35366/106227>
20. Taboada, B., Vazquez-Perez, J. A., Muñoz-Medina, J. E., Ramos-Cervantes, P., Escalera-Zamudio, M., Boukadida, C., Sanchez-Flores, A., Isa, P., Mendieta-Condado, E., Martínez-Orozco, J. A., Becerril-Vargas, E., Salas-Hernández, J., Grande, R., González-Torres, C., Gaytán-Cervantes, F. J., Vazquez, G., Pulido, F., Araiza-Rodríguez, A., Garcés-Ayala, F., González-Bonilla, C. R., ... Arias, C. F. (2020). Genomic Analysis of Early SARS-CoV-2 Variants Introduced in Mexico. *Journal of virology*, 94(18), e01056-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.01056-20>
21. Rodríguez-Maldonado, A. P., Vázquez-Pérez, J. A., Cedro-Tanda, A., Taboada, B., Boukadida, C., Wong-Arámbula, C., Nuñez-García, T. E., Cruz-Ortiz, N., Barrera-Badillo, G., Hernández-Rivas, L., López-Martínez, I., Mendoza-Vargas, A., Reyes-Grajeda, J. P., Alcaraz, N., Peñaloza-Figueroa, F., Gonzalez-Barrera, D., Rangel-DeLeon, D., Herrera-Montalvo, L. A., Mejía-Nepomuceno, F., Hernández-Terán, A., ... Ramírez-González, J. E. (2021). Emergence and spread of the potential variant of interest (VOI) B.1.1.519 of SARS-CoV-2 predominantly present in Mexico. *Archives of virology*, 166(11), 3173–3177. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05208-6>
22. Taboada, B., Zárate, S., Isha, P., Boukadida, C., Vazquez-Perez, J. A., Muñoz-Medina, J. E., Ramírez-González, J. E., Comas-García, A., Grajales-Muñiz, C., Rincón-Rubio, A., Matías-Florentino, M., Sanchez-Flores, A., Mendieta-Condado, E., Verleyen, J., Barrera-Badillo, G., Hernández-Rivas, L., Mejía-Nepomuceno, F., Martínez-Orozco, J. A., Becerril-Vargas, E., López, S., ... Arias, C. F. (2021). Genetic Analysis of SARS-CoV-2 Variants in Mexico during the First Year of the COVID-19 Pandemic. *Viruses*, 13(11), 2161. <https://doi.org/10.3390/v13112161>
23. Boukadida, C., Taboada, B., Escalera-Zamudio, M., Isa, P., Ramírez-González, J. E., Vazquez-Perez, J. A., Muñoz-Medina, J. E., Grajales-Muñiz, C., González-Torres, C., Gaytán-Cervantes, F. J., Rincón-Rubio, A., Matías-Florentino, M., Esteban Paz-Juárez, H., Sanchez-Flores, A., Mendieta-Condado, E., Barrera-Badillo, G., Hernández-Rivas, L., López, S., López-Martínez, I., Ávila-Ríos, S., ... Arias, C. F. (2022). Genomic Characterization of SARS-CoV-2 Isolated from Patients with Distinct Disease Outcomes in Mexico. *Microbiology spectrum*, 10(1), e0124921. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01249-21>
24. Isha, P., Taboada, B., García-López, R., Boukadida, C., Ramírez-González, J. E., Vázquez-Pérez, J. A., Hernández-Terán, A., Romero-Espinoza, J. Á., Muñoz-Medina, J. E., Grajales-Muñiz, C., Rincón-Rubio, A., Matías-Florentino, M., Sanchez-Flores, A., Mendieta-Condado, E., Barrera-Badillo, G., López, S.,

- Hernández-Rivas, L., López-Martínez, I., Ávila-Ríos, S., & Arias, C. F. (2022). Metagenomic analysis reveals differences in the co-occurrence and abundance of viral species in SARS-CoV-2 patients with different severity of disease. *BMC infectious diseases*, 22(1), 792. <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07783-8>
25. México se fortalece en la vigilancia genómica y amplía la capacidad de su red de laboratorios de salud pública <https://www.paho.org/es/noticias/7-10-2022-mexico-se-fortalece-vigilancia-genomica-amplia-capacidad-su-red-laboratorios>
26. Profesionales de laboratorio de nueve países de las Américas y de México se capacitan en la detección de la viruela símica con apoyo del InDRE y de OPS. <https://www.paho.org/es/noticias/21-6-2022-profesionales-laboratorio-nueve-paises-americas-mexico-se-capacitan-deteccion>
27. Brote de meningitis micótica asociado con procedimientos realizados con anestesia epidural en Matamoros, México <https://www.cdc.gov/hai/outbreaks/es/meningitis-epidural-anesthesia.html>
28. Gutierrez, B., da Silva Candido, D., Bajaj, S., Rodriguez Maldonado, A. P., Ayala, F. G., Rodriguez, M. L. T., Rodriguez, A. A., Arámbula, C. W., González, E. R., Martínez, I. L., Díaz-Quirón, J. A., Pichardo, M. V., Hill, S. C., Thézé, J., Faria, N. R., Pybus, O. G., Preciado-Llanes, L., Reyes-Sandoval, A., Kraemer, M. U. G., & Escalera-Zamudio, M. (2023). Convergent trends and spatiotemporal patterns of Aedes-borne arboviruses in Mexico and Central America. *PLoS neglected tropical diseases*, 17(9), e0011169. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011169>
29. Matteson, N. L., Hassler, G. W., Kurzban, E., Schwab, M. A., Perkins, S. A., Gangavarapu, K., Levy, J. I., Parker, E., Pride, D., Hakim, A., De Hoff, P., Cheung, W., Castro-Martinez, A., Rivera, A., Veder, A., Rivera, A., Wauer, C., Holmes, J., Wilson, J., Ngo, S. N., ... Zeller, M. (2023). Genomic surveillance reveals dynamic shifts in the connectivity of COVID-19 epidemics. *Cell*, 186(26), 5690–5704.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.11.024>
30. Adelino, T. É. R., Giovanetti, M., Fonseca, V., Xavier, J., de Abreu, Á. S., do Nascimento, V. A., Demarchi, L. H. F., Oliveira, M. A. A., da Silva, V. L., de Mello, A. L. E. S., Cunha, G. M., Santos, R. H., de Oliveira, E. C., Júnior, J. A. C., de Melo Iani, F. C., de Filippis, A. M. B., de Abreu, A. L., de Jesus, R., de Albuquerque, C. F. C., Rico, J. M., ... Alcantara, L. C. J. (2021). Field and classroom initiatives for portable sequence-based monitoring of dengue virus in Brazil. *Nature communications*, 12(1), 2296. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22607-0>
31. Gutierrez, B., da Silva Candido, D., Bajaj, S., Rodriguez Maldonado, A. P., Ayala, F. G., Rodriguez, M. L. T., Rodriguez, A. A., Arámbula, C. W., González, E. R., Martínez, I. L., Díaz-Quirón, J. A., Pichardo, M. V., Hill, S. C., Thézé, J., Faria, N. R., Pybus, O. G., Preciado-Llanes, L., Reyes-Sandoval, A., Kraemer, M. U. G., & Escalera-Zamudio, M. (2023). Convergent trends and spatiotemporal patterns of Aedes-borne arboviruses in Mexico and Central America. *PLoS neglected tropical diseases*, 17(9), e0011169. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011169>

ESTUDIO DE LOS GENOTIPOS DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH) PREVALENTES EN LESIONES CERVICALES EN LA POBLACIÓN MEXICANA

Noé Escobar Escamilla / noe.escobar@salud.gob.mx

David Esaú Fragoso-Fonseca

Estela Corona-Valdespino

Elizabeth Andrade-Montiel

María del Carmen Esteban-Valencia

Mayra Jiménez-Morales

Magaly Guadalupe Landa-Flores

Abril Paulina Rodríguez-Maldonado

Claudia Elena Wong-Arámbula

Imelda Eréndira Molina-Gómez

Lucía Hernández-Rivas

Departamento de Biología Molecular, Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), Dirección General de Epidemiología (DGE), México.

Diana Rangel-Medrano

Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva (CNEGSR), Secretaría de Salud, México.

Ubaldo Emilio Ruiz-Hernández

Laboratorio de Investigación Clínica y Ambiental, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional (IPN), México.

Iker Reja-Macouzet

Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad Simón Bolívar, México.

Introducción

En México, las estimaciones sobre cáncer de cuello uterino (CCU) indican que cada año se diagnostican 9,439 mujeres y 4,335 mueren a causa de la enfermedad, lo que lo convierte en el segundo cáncer con mayor incidencia y el tercero en causar defunciones. La infección persistente por algunos genotipos del Virus del Papiloma Humano (VPH) es una causa bien establecida para el desarrollo de lesiones precursoras y malignas. Los (VPH) constituyen un grupo heterogéneo de organismos que colonizan los epitelios mucosos y cutáneos del

cuerpo. A la fecha, más de 220 genotipos se han incorporado a la clasificación taxonómica y entre estos, 14 (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59) han sido asociados al desarrollo de lesiones neoplásicas, y, por lo tanto, se les ha designado como genotipos de alto riesgo carcinogénico (VPH-AR). La prevalencia de VPH-AR en muestras cervicales está relacionada con la edad, siendo más alta en el grupo de mujeres de 25 a 34 años y disminuyendo hasta la edad cercana a la menopausia, en la que, en algunas poblaciones, se observa un segundo incremento en la frecuencia de infección. En las mujeres mexicanas, la prevalencia de VPH-AR es del 32% en el grupo de 25 a 34 años, disminuyendo al 18% en el grupo de 55 a 64 años. En la población objetivo del programa de prevención de CCU (mujeres de 35 a 64 años) coordinado por el CNEGSR, las prevalencias más altas se encuentran en los grupos de 35 a 39 y de 60 a 64 años (10.4% y 10.1%, respectivamente) y la más baja se presenta en el grupo de 45 a 49 años (8.7%). Adicionalmente, los VPH-AR muestran una distribución geográfica dependiente de cada población y del estadio citológico. En México, de forma general, el grupo de 56, 59 y 66 es el más frecuente, seguido del grupo de 35, 39 y 68. Los genotipos más representados después de los grupos mencionados son diferentes en cada Entidad e incluyen a 31, 16, 51 y 52. Por otra parte, los VPH-AR más frecuentes en muestras de citología normal y en lesiones de bajo grado son 16, 33, 18, 58; en lesiones de alto grado son 16, 58, 33 y 31 y en muestras de CCU son 16, 18, 45 y 31. En la población objetivo del programa de prevención, la tasa de positividad a los VPH-AR en 2019 fue del 13.3% y el 77.5% de los genotipos identificados corresponden a aquellos distintos a 16 y a 18, un 10.1% a 16 y un 4.2% a 18. La diferencia en la frecuencia de identificación, que refleja un riesgo oncogénico distinto para cada genotipo, se explica en parte a diferencias a nivel genómico que tienen un impacto en la replicación viral y capacidad de generar una infección persistente. La acumulación de mutaciones en el genoma viral de cada genotipo da lugar a la definición de variantes intragenotípicas. Estas variantes se denominan linajes y sublinajes y en la secuencia del genoma completo, presentan una diferencia de aproximadamente el 1% y 0.5 a <1%, respectivamente. En los genotipos 16, 18 y 45 se ha establecido que cada variante posee tanto una distribución geográfica diferente y dependiente de la población de estudio, como un riesgo oncogénico distinto.

Justificación

En la población objetivo del programa de prevención del CCU, la frecuencia individual de los VPH-AR distintos a 16 y 18 se desconoce, a pesar de que se identifican en una mayor proporción. Esto se debe a que la mayoría de las técnicas moleculares empleadas para el tamizaje primario no están diseñadas para la diferenciación de cada genotipo. Además, en México la distribución geográfica de los linajes y sublinajes de los VPH-AR más frecuentes ha sido poco estudiada y se ha centrado principalmente en el análisis de VPH16 y 18, por lo que el análisis de las variantes del resto de genotipos no se encuentra descrito. Por las razones mencionadas anteriormente, es importante, por un lado, conocer la distribución de los VPH-AR más frecuentes en la población objetivo del programa de prevención del CCU y por otro, diseñar estrategias experimentales para conocer la distribución geográfica de sus variantes intragenotípicas.

Objetivos

Determinar la frecuencia de genotipos de VPH-AR en muestras cervicales obtenidas en diferentes Entidades y diseñar estrategias para la obtención de genomas completos y de fragmentos genéticos informativos de los VPH-AR más frecuentes en la población mexicana.

Metodología

Se realizó un análisis retrospectivo en muestras residuales de cepillado cervical, positivas a los VPH-AR. Estas muestras, recolectadas en el vial ThinPrep™ Pap Test PreservCyt™ Solution (Hologic, catálogo 70097-003) durante 2022 y 2023, fueron analizadas previamente durante el tamizaje primario realizado en los laboratorios de apoyo al programa de prevención de CCU. La genotipificación de VPH-AR mediante PCR en tiempo real multiplex se realizó utilizando el estuche comercial Anyplex™ II HPV HR Detection (Seegene, catálogo HP7E00X), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la identificación de variantes intragenotípicas, inicialmente se construyeron bases de datos con secuencias genómicas de los genotipos 16, 18, 31, 33, 58 y 59, obtenidas de la base de datos *NCBI Virus* (disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/virus/vssi/>). Estas bases de datos incluyeron los genomas de referencia de cada linaje y sublinaje, establecidos en la plataforma Papillomavirus Episteme (disponible en: <https://pave.niaid.nih.gov/index>) y fueron utilizadas para llevar a cabo los análisis filogenómicos por el método de Máxima Verosimilitud en el programa MEGA X (Kumar et al., 2018), con el fin de asignar los linajes y sublinajes, así como identificar las mutaciones específicas de cada uno. Para obtener los genomas virales completos, se diseñaron iniciadores de PCR utilizando el programa Primer3Plus (Untergasser et al., 2007) para amplificar 5 fragmentos genómicos, empleando como molde la secuencia de referencia del linaje A y sublinaje A1 de cada genotipo. La especificidad de los oligonucleótidos se verificó *in silico* mediante la comparación con las bases de datos mencionadas anteriormente. Posteriormente, se estandarizaron las condiciones de amplificación y los productos fueron visualizados en geles de agarosa al 2%. Estos productos fueron mezclados para la secuenciación en la plataforma NextSeq™ 550 (Illumina). El análisis bioinformático para el ensamblaje de los genomas se realizó utilizando el programa CLC Genomics Workbench (QIAGEN) y la clasificación de los genomas se llevó a cabo a través de un análisis filogenómico. Adicionalmente, para los genotipos 16, 18 y 31 se diseñaron iniciadores de PCR para amplificar regiones genéticas cortas e informativas que contienen mutaciones específicas de cada variante. Se estandarizaron las condiciones de amplificación y los productos fueron visualizados en geles de agarosa al 2%. La secuenciación de los productos se llevó a cabo en el sistema 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems™) utilizando ambos iniciadores. La edición de los electroferogramas se realizó en el programa Chromas (Disponible en <https://technelysium.com.au/wp/chromas/>) y las secuencias genéticas se incorporaron a las bases de datos para realizar la identificación de variantes mediante análisis filogenético.

Resultados preliminares

Se seleccionaron y analizaron 1,212 muestras de citología normal, indeterminada y lesiones precursoras, provenientes de 9 Entidades (Yucatán, Chiapas, Estado de México, Tamaulipas, Oaxaca, Guanajuato, Aguascalientes, Nuevo León y Chihuahua) y se observó una proporción diferente de genotipos de VPH-AR en cada entidad. Los genotipos más frecuentes fueron 16, 31, 39, 51 y 52. Hasta diciembre de 2023, se habían obtenido un total

de 57 genomas virales, correspondiendo a VPH16 (n=10), VPH18 (n=14), VPH31 (n=14), VPH33 (n=4), VPH58 (n=4) y VPH59 (n=11). Además, se obtuvieron 150 secuencias genéticas de los siguientes genotipos: VPH16 (n=85), VPH18 (n=33), VPH31 (n=32). De las 207 secuencias en total, 140 se han depositado en la base de datos GenBank y se encuentran disponibles para su consulta y análisis. La proporción de variantes en los genotipos analizados fue la siguiente: VPH16 A>D>B; VPH18 A>B; VPH31 C>B>A; VPH33 A1>B1; VPH58 A2>A3 y VPH59 B1>A2.

Conclusiones

Se obtuvo la distribución de genotipos de VPH-AR en una población de muestras obtenidas de diferentes Entidades como parte del tamizaje primario que realiza el programa de prevención de CCU. Además, por primera vez en México, se diseñó una estrategia para llevar a cabo el estudio a nivel genómico de los genotipos de VPH-AR más frecuentes y otra estrategia para la diferenciación de linajes mediante el análisis de un fragmento genético informativo, que puede ser una alternativa a la obtención de genomas virales en el análisis de muestras con baja carga viral, o implementada en laboratorios con capacidad de secuenciación convencional de ADN mediante el método de Sanger.

Prospectivas

Es necesario continuar con la genotipificación de los VPH-AR en el resto de Entidades y en el corto plazo, establecer un sistema de vigilancia epidemiológica que permita conocer su frecuencia y distribución geográfica en la población objetivo del programa de prevención del CCU. Ambas metodologías permitirán llevar a cabo futuros estudios epidemiológicos para determinar la distribución geográfica de las variantes de los genotipos 16, 18, 31, 33, 58 y 59. Es necesario diseñar estrategias para el análisis genético y genómico de otros VPH-AR frecuentes en lesiones precursoras y en CCU, como VPH52 y VPH45. Las metodologías desarrolladas en este trabajo pueden ser útiles en estudios de investigación clínica, para establecer la frecuencia de variantes en diferentes estadios citológicos y determinar el riesgo específico de infección persistente y desarrollo de lesiones precursoras.

Reconocimientos

Los resultados obtenidos en esta investigación han sido posibles gracias a las gestiones realizadas por parte de la Dirección de Cáncer de la Mujer del CNEGSR y de la Dirección de Servicios y Apoyo Técnico del InDRE y a las facilidades otorgadas por el equipo de tamizaje de CCU del CNEGSR y por la Red de Laboratorios de Salud Pública.

Fuentes de financiamiento

Este trabajo no cuenta con fuentes de financiamiento externo, los recursos humanos y materiales son financiados por la Secretaría de Salud del gobierno de México.

Bibliografía

- Fragoso-Fonseca, D. E., Ruiz-Hernández, U. E., Trujillo-Salgado, B. B., Manuell-Barrios, R. T., Garcés-Ayala, F., Del Mazo-López, J. C., Méndez-Tenorio, A., Hernández-Rivas, L., Ramírez-González, J. E., & Escobar-Escamilla, N. (2022). Analysis of the genomic diversity of human papillomavirus type 31 in cervical samples reveals the presence of novel sublineages in clade C. *Archives of virology*, 167(12), 2795–2800. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05589-2>

- Escobar-Escamilla, N., González-Martínez, B. E., Araiza-Rodríguez, A., Fragoso-Fonseca, D. E., Pedroza-Torres, A., Landa-Flores, M. G., Garcés-Ayala, F., Mendieta-Condado, E., Díaz-Quíñonez, J. A., Castro-Escarpulli, G., & Ramírez-González, J. E. (2019). Mutational landscape and intra-host diversity of human papillomavirus type 16 long control region and E6 variants in cervical samples. *Archives of virology*, *164*(12), 2953–2961. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04407-6>
- Escobar-Escamilla, N., Ramírez-González, J. E., Castro-Escarpulli, G., & Díaz-Quíñonez, J. A. (2018). Utility of high-throughput DNA sequencing in the study of the human papillomaviruses. *Virus genes*, *54*(1), 17–24. <https://doi.org/10.1007/s11262-017-1530-3>

VISITA A EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS. COVID-19, RETOS Y EXPERIENCIAS

Eréndira Molina Gómez / erendira.molina@salud.gob.mx

Departamento de Biología Molecular y Validación de Técnicas, Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), Dirección General de Epidemiología (DGE), México

Claudia Gómez Palomino

Carmen Guzmán Bracho

Ilse Rosario Franco Mosqueda

Coordinación para la Gestión de Evaluaciones de Pruebas Diagnósticas, Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), Dirección General de Epidemiología (DGE), México

En México, la vigilancia epidemiológica por laboratorio tiene como referente del diagnóstico de enfermedades transmisibles al Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Dentro de las atribuciones federales, se realiza la evaluación de pruebas comerciales dirigidas al diagnóstico de enfermedades infecciosas de importancia en la salud pública nacional. Este proceso permite identificar las pruebas que pueden ser aplicables en los laboratorios que integran la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP) en el país, así como en laboratorios públicos y privados, del sector salud y académico, una vez que estén disponibles en el mercado nacional.

Si bien, la evaluación de las pruebas comerciales en el InDRE (entonces Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales¹), adquirió un primer impulso con la introducción en el país de reactivos comerciales para la detección del virus de la inmunodeficiencia humana tras la llegada de la epidemia al país en 1985, no fue sino hasta 2003 cuando se estableció el procedimiento para otros padecimientos sujetos a vigilancia epidemiológica. En 2018, un grupo colegiado interno se formalizó como árbitro del proceso para facilitar la coordinación, deliberación y toma de decisiones. En la actualidad, la evaluación de pruebas comerciales de diagnóstico es un proceso sustantivo institucional auxiliar y transversal al proceso diagnóstico del InDRE. El servicio se ofrece a los fabricantes de las pruebas, y tiene como propósito comprobar el cumplimiento de los parámetros de desempeño y su uso previsto, descritos ambos en la información proporcionada por el fabricante. Tras la revisión documental se diseña un protocolo estructurado para realizar la verificación técnica en el laboratorio.

Al ser un proceso transversal, los principales actores internos están distribuidos en toda la estructura institucional. Las jefaturas de los laboratorios son los elementos fundamentales y se encargan de la verificación analítica. Algunas de ellas son las responsables de una de las redes de diagnóstico específico que operan a nivel nacional (vih, sífilis, brucelosis, arbovirus, chagas, tuberculosis, hepatitis, paludismo, virus respiratorios) y otros realizan

¹ Ramírez-Hernández JA, Guzmán-Bracho C y Díaz-Quinonez JA Desde el ISET al InDRE. I. Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales: Génesis y primeros años, 1934-1940. Gac Med Mex. 2019. 155(3):322-327. doi: 10.24875/GMM.19005157.

pruebas especializadas para la vigilancia epidemiológica por laboratorio (carga viral, VPH), incluso ciertas jefaturas son responsables técnicos de alguno de los cuatro Centros Colaboradores de la Organización Mundial de la Salud o de laboratorios de referencia regional que tiene el InDRE.²

El procedimiento completo consta de dos fases: revisión documental y evaluación técnica. Los documentos entregados por el solicitante son inspeccionados con atención y cuidado con una estrategia polietápica (cumplimiento de requisitos, revisión técnica y aprobación del Comité) para asegurar el cumplimiento de criterios administrativos, técnicos y operativos. El producto de esta primera fase es un protocolo de evaluación de la prueba que se hace de conocimiento al solicitante. Una vez aceptado el protocolo, el solicitante entrega los reactivos e insumos necesarios para evaluar la prueba, sean importados o de producción nacional, lo que detona la evaluación técnica con una serie de pasos secuenciales: capacitación, demostración de funcionalidad, desarrollo de protocolo, análisis de resultados para finalizar con el informe de resultados que es entregado al solicitante.

La pandemia producida por SARS-CoV-2 generó la necesidad de demostrar la presencia de este agente viral de rápida propagación, productor de un nuevo síndrome respiratorio de alta letalidad. La incorporación de las pruebas de diagnóstico molecular al mercado comercial mundial fue exponencial ya que la confirmación etiológica de casos de infección respiratoria aguda requería de la demostración del ARN viral utilizando las herramientas del diagnóstico molecular denominadas pruebas de transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR por sus siglas del inglés quantitative reverse transcription polymerase chain reaction), realizadas con secreciones de vías respiratorias altas obtenidas de individuos con datos clínicos y epidemiológicos que respaldaron la sospecha de padecer COVID-19.

En esta etapa inicial de incertidumbre global, en los laboratorios de salud pública había gran efervescencia dirigida a enfrentar el reto de diagnóstico etiológico. Los Centros de Control de Enfermedades de Estados Unidos y el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades de la Unión Europea pusieron a disposición sendos protocolos para el diagnóstico; la Organización Panamericana de la Salud promovió el uso del protocolo desarrollado por el grupo del Dr. Christian Drosten en Berlín para implementar el diagnóstico en los laboratorios de referencia de América Latina en apoyo a la emergencia en salud pública.

El 31 de diciembre de 2019, fue reportado a la Organización Mundial de la Salud el primer caso de COVID-19 en el mundo. A finales de enero el virus se había dispersado hacia diferentes zonas geográficas del mundo produciendo poco más de 100 casos: en Asia Pacífico (Tailandia, Singapur, Japón, Taiwán, Corea del Sur, entre otros) y en América (Estados Unidos y Canadá), en Oceanía (Australia) y en Europa (Francia, Alemania, Italia y Finlandia). En México, el primer caso fue confirmado el 27 de febrero de 2020 en un viajero mexicano infectado en Italia.

Poco antes de la disponibilidad de pruebas comerciales, apenas iniciado el año 2020, en el InDRE se estandarizó una de las primeras técnicas moleculares para la identificación del nuevo Coronavirus a nivel mundial. A partir del 3 de febrero, el InDRE y la Red Nacional de Laboratorios en Salud Pública pusieron en funcionamiento en todo el país una de las pruebas recomendadas por la OMS dando la suficiencia técnica para el diagnóstico por

² Díaz-Quíñonez JA, Ramírez-Hernández JA, Rodríguez-Pérez ME, Viesca-Treviño C, Guzmán-Bracho C. Del ISET al InDRE. V. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Posición estratégica global, 2012-2019. Gac Med Mex. 2020;156:237-246. Doi: 10.24875/GMM.M20000383

laboratorio al Sistema Nacional de Salud y fortalecer la capacidad de respuesta. Sin embargo, a pesar de la implementación de las recién desarrolladas pruebas en las redes de laboratorios oficiales, no solo en México, sino de todo el mundo, el abasto de reactivos de diagnóstico era insuficiente. De tal manera que la industria enfocó sus esfuerzos al desarrollo y comercialización de reactivos comerciales. La inmediatez de esta necesaria y valiosa respuesta, permitió la presencia de prueba diagnósticas de desempeños variables de origen multifactorial, entre ellos la experiencia del fabricante en la logística para el traslado de las pruebas a diferentes puntos de la geografía mundial, y otros asociados a la aplicabilidad en el diagnóstico como son el diseño de la prueba, la calidad de la toma y el manejo de la muestra.

En el primer bimestre del año, en el InDRE se decidió extender la cobertura de servicios de diagnóstico por laboratorio a participantes externos a la RNLS. Para ello, era indispensable que las pruebas introducidas al mercado nacional se evaluaran para determinar su utilidad diagnóstica durante el evento pandémico. Así, se puso pausa temporal a las evaluaciones de pruebas para los diagnósticos distintos a la detección del SARS-CoV-2. El 28 de febrero se inició la denominada identificación de pruebas útiles de RT-qPCR para este nuevo virus, a partir de las pruebas que fabricantes y distribuidores deseaban poner a disposición en el mercado comercial mexicano. Se evaluaron las pruebas ingresadas al InDRE durante los siguientes ocho meses, cuando se modificó la recepción de solicitudes exclusivas para COVID-19 en previsión de la entrada de la temporada invernal de influenza correspondiente, ampliando el servicio a solicitudes de pruebas multiplexadas diseñadas para detectar y diferenciar de manera simultánea el ácido nucleico de los virus SARS-CoV-2 e Influenza. Posteriormente, poco a poco se fueron introduciendo pruebas con marcadores moleculares para otros virus respiratorios.

El detonador del proceso de evaluación de pruebas diagnósticas comerciales durante la pandemia fue el lanzamiento de la convocatoria a través del sitio web institucional, tal como se realiza de manera habitual para los procedimientos ordinarios o de respuesta ante eventos de interés epidemiológico. El proceso es coordinado de manera centralizada por el área de Gestión de Evaluaciones de Pruebas Diagnósticas, quien es el punto de enlace entre el solicitante y el área técnica evaluadora, responsable de mantener el flujo bidireccional de la comunicación entre las partes. Cuenta con el grupo colegiado interno para el seguimiento puntual del procedimiento institucional y la resolución de peticiones o inconformidades.

Los fabricantes o distribuidores interesados entregaron la solicitud de evaluación en el InDRE, con la documentación indicada en los requisitos establecidos en la convocatoria. La información recibida a partir del 21 de febrero, se revisó y analizó de manera secuencial en tres pasos: 1) verificación del cumplimiento de requisitos administrativos, 2) revisión técnica y elaboración del protocolo y 3) aprobación del protocolo propuesto.

Con la verificación del cumplimiento de requisitos administrativos, se les dio admisión a aquellas solicitudes entregadas con la información técnica y administrativa completa para dar continuidad hacia la evaluación técnica. A partir de la apertura del servicio, la afluencia de solicitudes creció rápidamente. En abril se triplicó el ingreso de solicitudes (de 18 a 63); cerca de dos tercios cumplieron con todos los requisitos, el trámite del restante 41% de las solicitudes fue desechado en este primer paso de la revisión documental.

Después de un minucioso análisis de la información técnica facilitada por el solicitante se identificaron las características del diseño de la prueba, los resultados de la validación del fabricante, así como el contenido del estuche comercial, los insumos no incluidos y se aseguró la disponibilidad del material biológico necesario en el biobanco. Con los datos

recabados se elaboró el protocolo para la **evaluación técnica comparativa** correspondiente, que en todos los casos consideró la RT-qPCR del InDRE como prueba de referencia para confrontar los resultados, así como el material de control o paneles de tercera opinión. Cada protocolo elaborado fue expuesto en sesión específica al solicitante para su conocimiento y aprobación. El solicitante recibió un oficio de aceptación de evaluación para tramitar el permiso de importación de los reactivos e insumos requeridos en la evaluación ante la agencia reguladora (Comisión Federal para Riesgos Sanitarios –COFEPRIS-) encargada de la autorización para importación y comercialización de estos productos.

Un punto crítico durante el arranque de este procedimiento fue la disponibilidad del material biológico en los laboratorios del InDRE, así como del material de control. Por la carencia de productos comerciales, principalmente en el primer mes de este proceso, se elaboraron controles positivos sintéticos y se utilizaron muestras provenientes de individuos con enfermedades respiratorias diferentes a COVID-19, resguardadas en el InDRE. En la mayoría de las evaluaciones, las características de desempeño de las pruebas comerciales se determinaron con los resultados obtenidos al procesar material biológico de los biobancos del InDRE y, una vez disponibles, con los resultados de los materiales de referencia de SARS-CoV-2 comerciales.

El biobanco de COVID-19 dependiente del Laboratorio de Virus Respiratorios, aportó el material biológico con resultados positivos o negativos a SARS-CoV-2 obtenido de individuos con sospecha de padecer esta enfermedad en cualquiera de las diferentes fases de evolución, asintomáticos o bajo manejo terapéutico en evaluación. También aportaron muestras para otros virus respiratorios. Una alta proporción de las muestras resguardadas en la institución son recolectadas por personal de los laboratorios de la RNLSP y cuentan con trazabilidad desde la toma de muestra hasta el reporte de resultados, almacenamiento y cadena de custodia. El panel de evaluación para obtener los datos necesarios para la estimación de los parámetros de desempeño se integró por: muestras negativas a SARS-CoV-2 provenientes de población mexicana, el control positivo del reactivo, muestras positivas a SARS-CoV-2 provenientes de población mexicana, panel de referencia comercial con muestras positivas y negativas a SARS-CoV-2 y paneles de tercera opinión comerciales con células bacterianas, fúngicas o partículas virales de agentes de otras enfermedades respiratorias.

Posterior a la recepción de los reactivos por el solicitante, se programó la capacitación del personal seleccionado para cada evaluación. Es importante comentar que se integró un grupo de evaluadores con profesionales del InDRE con experiencia en pruebas de PCR. (Foto 1).



Foto 1. Reunión de trabajo del grupo de evaluadores, integrado por analistas y personal de apoyo técnico-administrativo. Plaza principal del InDRE. 15 de agosto, 2020

Los reactivos y equipos necesarios para cada evaluación fueron recibidos y custodiados de acuerdo a procedimientos institucionales vigentes. Se asignaron áreas específicas, verificadas previamente para cada evaluación. Los equipos de mesa o piso se instalaron y calificaron de acuerdo a los requisitos del fabricante. Cuando se requirió utilizar algún equipo del InDRE, se aseguró su buen funcionamiento.

Con el personal capacitado y el equipo instalado en correcta operación se dio inicio a la evaluación. Ningún solicitante estuvo presente durante la evaluación para evitar conflictos de interés. Con los resultados obtenidos se elaboró el informe de resultados dirigido al solicitante y firmado por las autoridades institucionales. En la página de gobierno (www.gob.mx/salud) se encuentra el listado de las pruebas útiles para consulta del público interesado y dar transparencia a este proceso.

Para la identificación de las pruebas útiles se determinaron: sensibilidad analítica, especificidad analítica, precisión (repetibilidad o reproducibilidad) y en el caso de las plataformas automatizadas, los porcentajes de acuerdo positivo y negativo en muestras con resultado diagnóstico previo, determinado por las técnicas de referencia utilizadas en el InDRE y bajo criterios de aceptación preestablecidos (Cuadro 1).

Parámetro	Criterio de aceptación
Sensibilidad analítica	Límite de detección ≤ 250 copias
Especificidad analítica	100%
Precisión, repetibilidad o reproducibilidad	≥ 95%

Cuadro 1. Parámetros evaluados a las pruebas moleculares para identificar SARS-CoV-2. InDRE, 2020.

Con el paso del tiempo y en paralelo a la menor intensidad de las olas pandémicas, se introdujeron nuevos diseños diagnósticos, pruebas multiplexadas y pruebas para detección de antígeno que supusieron un desafío operativo para dar continuidad a la evaluación de estas pruebas. Entre otros, fue necesario proveer muestras para influenza, así como diseñar y desarrollar protocolos prospectivos para la evaluación de pruebas de antígeno en cartuchos aplicables por personal de salud o bien como auto-pruebas, en estrecha coordinación con unidades médicas.

En el periodo de 2020 a 2022 se recibieron un total de 433 solicitudes para realizar la evaluación de pruebas moleculares para SARS-CoV-2 o para la identificación conjunta con virus influenza, o bien, de pruebas para detección de antígeno tanto para aplicarse por el personal de salud como auto-pruebas, y de pruebas para la identificación de anticuerpos.

Durante el primer año, las pruebas moleculares representaron casi el 80% en las solicitudes recibidas, en 2021 se incorporan las pruebas de antígeno en el 69% de los casos y se evaluaron pruebas moleculares con diseños que incluían además el marcador para influenza (23%); en el tercer año, el 80% de las solicitudes que se recibieron en el InDRE fueron para la detección de antígeno, principalmente las diseñadas como auto-pruebas (63% del 80%).

Considerando que el arranque de esta estrategia se dio en la etapa de mayor aceleración de la actividad de la pandemia en el país, se presentaron dos retos operativos para iniciar el procedimiento: 1. Definir una estrategia de laboratorio con criterios técnicos uniformes para lograr la comparabilidad de los resultados obtenidos entre las diferentes pruebas que se fueran a evaluar y 2. Integrar un grupo técnico encargado tanto de la revisión documental de las solicitudes ingresadas por los proveedores, como de la ejecución de la evaluación por laboratorio. La evaluación de las pruebas en el laboratorio fue utilizada en pocos países, pues implica destinar recursos humanos y materiales para la verificación del desempeño de los estuches de forma previa a su comercialización, y puede retrasar el ingreso de reactivos para el diagnóstico debido a que la autorización por la entidad regulatoria local depende completamente de los resultados del laboratorio.

No obstante, ante la oferta creciente de estuches de diagnóstico, el principal logro de la estrategia de evaluación técnica de pruebas para COVID-19 en el InDRE fue identificar y hacer pública la lista de las pruebas diagnósticas con mejor desempeño para que usuarios institucionales y privados tuvieran respaldo para la decisión de compra, así como reducir el riesgo de que productos con desempeño analítico desfavorable pudieran ingresar al mercado nacional.

Artículo publicado

Gómez-Palomino C, Guzmán-Bracho C, Gordillo MM, Ramírez-González JE, Hernández RL, López MI et al. Identificación de pruebas comerciales de PCR útiles para detectar virus SARS-CoV-2 en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos durante el primer año de la pandemia de COVID-19 en México. Rev CONAMED. 2022; 27(2): 68-79. <https://dx.doi.org/10.35366/106227>

IDENTIFICACIÓN DE SARS-CoV-2 POR MÚLTIPLEX RT-PCR Y ELECTROFORESIS CAPILAR

Susana Revollo / susanarevollo@gmail.com

Cerruto Yashira

Conde Marcos

Laboratorio de Genética Molecular, Instituto SELADIS, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia

Cornejo Miguel

Departamento de Tecnologías de la Información y Comunicación, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia

La detección rápida de SARS-CoV-2 en muestras de pacientes es una herramienta crítica para monitorear la propagación de la enfermedad, guiar las decisiones terapéuticas y diseñar protocolos de distanciamiento social.

La prueba de RT-PCR en tiempo real para la identificación de SARS COV-2, utilizada como prueba “Gold Estándar” desde el inicio de la pandemia Covid 19, ha mostrado en algunos estudios, resultados falsos negativos y falsos positivos, por lo que se ha visto indispensable contar con una prueba que discrimine claramente estos resultados.

La electroforesis capilar (EC) es una herramienta de separación de biomoléculas, que puede realizarse en unos minutos; se requiere de pequeñas cantidades de muestra, con una alta reproducibilidad, y un error estándar relativo de tiempo de migración menor a 0,5%. Estas características hacen que la EC sea un método eficiente y económico con capacidad de separar cientos de componentes de forma simultánea, razones suficientes para ser una herramienta de elección para la identificación de SARS COV-2.

En el estudio se describe un enfoque técnico para la identificación de SARS-Cov-2 mediante la amplificación por Multiplex RT-PCR de secuencias del genoma viral de los genes N, S, y ORF1ab, seguidos de una electroforesis capilar (Multiplex RT-PCR- EC) en un equipo ABI 3.500.

La validación de esta prueba ha demostrado ser un método selectivo en un 97%, específico en un 91% y sensible en un 100%. Además, de haber mostrado una eficiencia del 98% y una precisión del 100%.

Esta prueba ha permitido, además, identificar resultados falsos positivos de COVID 19 diagnosticados con RT-PCR en tiempo real en un 16% de los pacientes incluidos en el estudio. Estos pacientes presentaban un CT cercanos al umbral de positividad.

La técnica Multiplex RT-PCR – EC puede ser una alternativa para facilitar el análisis cuando, por un lado, la demanda de pruebas de COVID-19 excediera la capacidad de la PCR y por otro, cuando se genere una incertidumbre en el valor de CT obtenido por RT-PCR en tiempo real.

INTRODUCCIÓN

El brote del coronavirus SARS-CoV-2, que comenzó en Wuhan, China en diciembre de 2019, se ha extendido rápidamente a múltiples países como una pandemia global. Para limitar la propagación de este virus y superar las crisis de la COVID-19 es importante identificar a los individuos sospechosos y aislarlos, lo que requiere pruebas diagnósticas confiables [1].

Las técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa (RT-PCR) en tiempo real (cuantitativa) se consideran el estándar de oro para el diagnóstico de COVID-19 [2,3]. Muchas empresas están respondiendo al desafío y desarrollando Kits diagnósticos de COVID-19 en base al RT PCR en tiempo real. Sin embargo, estas tecnologías diagnósticas tienen limitaciones específicas y reportan varios casos falsos positivos y falsos negativos, especialmente durante las primeras etapas de la infección [4].

Diversos estudios han abordado este desafío y estos esfuerzos han dado lugar a la comercialización de una variedad de kits de RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico molecular de COVID 19. Se han propuesto muchos protocolos para detectar el virus SARS-CoV-2 en fluidos nasofaríngeos, como la Múltiple RT-PCR [5, 6], CRISPR/Cas12 [7, 8] y CRISPR-Cas3 [9], inmunoensayo de flujo lateral [10], sensores biomoleculares basados en papel [11], pruebas SHERLOCK [12], DNA aptamer [13], amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) [14] y la electroforesis capilar de fragmento de ADN [15, 16].

La electroforesis capilar es una herramienta de separación de ácidos nucleicos, que presenta una alta resolución y puede realizarse en corto tiempo utilizando pequeñas cantidades de muestra, con una alta reproducibilidad, siendo una buena alternativa para el diagnóstico molecular de COVID 19.

Dado que la comprensión de los diagnósticos moleculares para COVID-19 todavía está evolucionando, sus limitaciones en el actual escenario de pandemia se deliberan para plantear preguntas de investigación futuras que mejorarían las tecnologías de diagnóstico para COVID-19 y sus variantes, además de futuras enfermedades infecciosas emergentes.

En el presente estudio, se describe un enfoque técnico de identificación de SARS-Cov-2 mediante la amplificación de fragmentos del genoma viral con 3 cebadores de los genes de las proteínas N, S, y ORF1ab, seguidos de una electroforesis capilar (Multiplex RT-PCR-EC) en un equipo ABI 3500. Asimismo, se realizó la validación de esta prueba como diagnóstico molecular para COVID 19 tomando como prueba gold estándar a la técnica RT-PCR en tiempo real.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

90 muestras de hisopado nasofaríngeo y orofaríngeo de pacientes con antecedentes presuntivo de Covid 19 (con diagnóstico clínico de sospecha de COVID 19 o que hubiera estado junto a un paciente positivo para COVID 19), fueron incluidas en el estudio. Las muestras fueron derivadas de los Laboratorios de Genética y Diagnóstico Molecular LABOGEN SRL de la ciudad de La Paz y el Laboratorio MikroMol de la ciudad de El Alto. Además, muestras colectadas en el Instituto SELADIS fueron también incluidas en el estudio.

Se tomaron muestras de hisopado nasofaríngeo y orofaríngeo en medios exclusivos de transporte viral, según la Guía para el Manejo del COVID-1 del Ministerio de Salud y Deportes [17].

Detección de SARS CoV-2 por RT-PCR en Tiempo Real

a) Extracción del ARN viral

El aislamiento del ARN de SARS CoV-2 se realizó mediante el uso del kit PureLink de Invitrogen™, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

b) Cuantificación del ARN extraído

Las cuantificaciones se realizaron por fluorimetría utilizando el equipo Qubit de Applied Biosystems™. Antes de cada medición, el equipo fue calibrado utilizando un kit de calibración exclusivo para el mismo.

c) RT-PCR en Tiempo Real

La mezcla de reacción se realizó mediante el uso del kit RIDA®GENE SARS-CoV-2 RUO r-biopharm, siguiendo las recomendaciones del fabricante. en un volumen final de 25 µl, la misma que incluye los siguientes reactivos: 19,3 uL del Mix PCR más 0,7 uL del Mix de Enzimas y 5 uL del ARN extraído de la muestra.

La mezcla fue dispensada en tiras de tubos ópticos PCR y sellada con tiras de tapas ópticas de Thermo Scientific™. Se utilizaron como controles, un ARN como Control Interno de Inhibición, un Control Positivo SARS-CoV-2 y un Control Negativo.

Las condiciones de reacción de la RT-PCR en Tiempo Real se ajustaron de la siguiente manera:

1) Transcripción inversa a 58°C durante 10 min, 2) Desnaturalización inicial a 95°C durante 1 minuto, 3) 45 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 10 seg y el alineamiento y extensión a a 60°C durante 30 seg. El equipo utilizado para el PCR en tiempo real fue el termociclador StepOne Plus™ de Applied Biosystems™.

Detección de SARS CoV-2 por Multiplex RT-PCR y Electroforesis Capilar (Multiplex RT-PCR-EC)

a) Extracción del ARN viral

El aislamiento del ARN de SARS CoV-2 se realizó mediante el uso del kit PureLink de Invitrogen™. Al inicio de cada proceso de aislamiento se introdujo a cada muestra 2 uL de un ARN control VetMax Xeno de Invitrogen, como control endógeno para posterior síntesis y detección del ADNc.

b) Multiplex RT-PCR

El proceso de transcripción reversa y amplificación por multiplex PCR, se realizó en un solo paso, utilizando el master mix Taqman Fast Virus 1 step Master Mix (4X) de Applied Biosystems. Se utilizaron 3 pares de cebadores marcados con fluorocromos (Primer orf 1ab Forward/Reverse, Primer S protein Forward/Reverse, Primer N protein, Forward/Reverse) para amplificar las secuencias de los genes de las proteínas ORF-1ab, S y N de SARS CoV-2.

Las secuencias y concentraciones de los cebadores utilizadas para amplificación del ADN por Multiplex PCR se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencias y concentraciones de los cebadores utilizados en el estudio.

	SECUENCIAS Y CONCENTRACIÓN CEBADOR EN DIRECCIÓN ANVERSA	SECUENCIA Y CONCENTRACIÓN CEBADOR EN DIRECCIÓN REVERSA
GEN Orf 1ab	Polyprotein orf1-ab forward 5-TGCCTGGAATATTGGTGAA-3 Orf 1 ab 5' (primer forward) 80 uM	Polyprotein orf1-ab reverse 5-ACAATTTCAAGCACAGGTTGAG-3 Orf 1 ab 5' (primer reverse) 80 uM
GEN S	S gene forward 5-TCGAAGACCCAGTCCCTACTTATT-3 Gen "S" 5' (primer forward) 80 uM	S gene reverse 5-CTGAAGAAGAATCACCAGGAGTCAA-3 Gen "S" 5' (primer reverse) 80 uM
GEN N	N gene forward 5-GGACCAGGAATAATCAGACAAGGA-3 Gen "N" 5' (primer forward) 80 uM	N gene reverse 5-TTAGGCCTGAGTTGAGTCAGC-3 Gen "S" 5' (primer reverse) 80 uM
Control Positivo Endógeno de ARN	VetMAX Xeno RNA control forward 5-GCTGACTCCAGTGGTGAAAC-3 CE de ARN (primer forward) 80 uM	VetMAX Xeno RNA control reverse 5-ACCCTTGCTAGTAGGTGTAGATTCTC-3 CE de ARN (primer reverse) 80 uM

Todas las mezclas de PCR utilizadas, se prepararon de acuerdo con las recomendaciones del fabricante Thermofisher™. Tanto los cebadores como el control positivo endógeno de ARN fueron diluidos a una concentración de 1:100 en Tampón TE, haciendo un pool de los mismos que fue añadido a la mezcla de PCR, haciendo un volumen total de 4 uL por tubo (Tabla 2). El procedimiento fue realizado en un Termociclador Veriti™ de Applied Biosystems™. Utilizando un proceso de ciclaje de 40 ciclos.

Tabla 2. Mezcla de PCR para Múltiplex PCR.

Componente	Volúmen/tubo
Master Mix	2.5 UI
Pool de secuencias de cebadores	1.0 UI
Control positivo endógeno de ARN	0.5 UI
TOTAL	4 UI

La amplificación se realizó en 40 ciclos utilizando el programa descrito en la Tabla 3:

Tabla 3. Programa de amplificación del ADN transcrito por Múltiplex PCR.

	Transcripción reversa	Activación de Polimerasa	Desnaturalización	Hibridación y extensión	Extensión final	Temperatura final
T°	50°C	95°C	95°C	60°C	72°C	4°C
Tiempo	15 minutos	2 minutos	3 segundos	45 segundos	7 minutos	infinito

c) Electroforesis Capilar

Una vez amplificadas las secuencias de ADN de los genes N, S, y ORF1ab de SARS CoV-2, estos fueron sometidos a la electroforesis capilar por 45 minutos en un Analizador Genético ABI 3500™ de Applied Biosystems™ utilizando un capilar de 36 cm.

Se realizó la preparación de la solución de corrida utilizando los componentes indicados en la Tabla 4 y se dispensaron 10 ul de esta mezcla en cada pocillo de la placa.

Tabla 4. Componentes de la solución de corrida.

Componente	Volúmen (ul)
Formamida (HiDi)	8.5
Gene scan liz 600	0.5
DNA amplificado	1.0
TOTAL	10

Se realizó un proceso de desnaturalización de las muestras llevándolas al Termociclador Veriti™ para un ciclo de desnaturalización a 95°C por 3 minutos y luego la placa fue llevada a -20°C por un tiempo de 2 minutos, finalmente se introdujo la placa en el Analizador Genético ABI 3500™. Se verificaron los parámetros de corrida y se realizó la corrida por un tiempo de 25 minutos.

Para la programación de parámetros de corrida se realizó de manera previa una calibración con la matriz de DS 33 (DYE SET G5) para 6-FAM,VIC;NED;PET y TED, se ubicó la placa de reacción en el equipo ABI 3500 y se seleccionó el módulo de corrida en el panel de fragmentos acorde a la longitud del capilar (36 cm), número de capilares (8), tipo de polímero (POP4) y matriz G5. Este procedimiento fue realizado con la asistencia del software Data Collection V.2.5.

Los resultados fueron visualizados a través del *software* GeneMapper V. 1.0, adaptado para la lectura con el fluoróforo VIC, dejando evidenciar los electroferogramas de los fragmentos amplificados.

Los fragmentos generados por los cebadores marcados con el fluoróforo VIC tienen aproximadamente las siguientes longitudes:

- a) Control endógeno (VetMax Xeno) : 327 nucleótidos
- b) Gen que codifica para la proteína N: 327 nucleótidos
- c) Gen que codifica para la proteína Orf 1ab : 425 nucleótidos
- d) Gen que codifica para la proteína S : 437 nucleótidos

d) Interpretación de resultados

Se realizó verificando la presencia o ausencia de los picos generados. Un resultado Positivo para COVID 19 por Multiplex RT-PCR y Electroforesis Capilar se interpretó cuando los picos de los 3 genes del virus SARS CoV-2 (N, ORF1ab y S) se hicieron visibles en el electroferograma. Se utilizó un control positivo interno (XENO™ RNA CPI) para evidenciar que el procedimiento se realizó correctamente, pico que también fue visualizado, Figura 1.

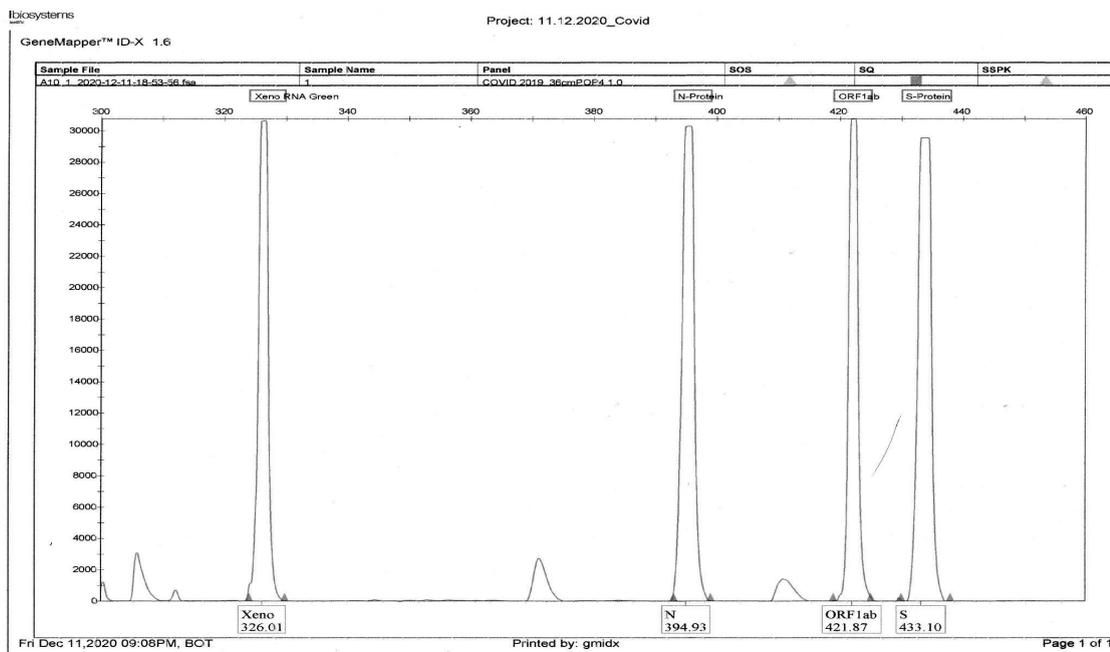


Figura 1. Resultado Positivo para COVID 19 por MÚltiplex RT-PCR y Electroforesis Capilar donde se puede visualizar los picos de los 3 genes del virus SARS CoV-2 (N, ORF1ab y S), además se visualizó el pico del control endógeno interno ((XENO™ RNA CPI).

Un resultado Negativo para COVID 19 por Multiplex RT-PCR y Electroforesis Capilar se interpretó cuando no se visualizó ninguno de los picos de los 3 genes del virus SARS CoV-2, pero si se visualizó el pico del control positivo interno (XENO™ RNA CPI) Figura 2.

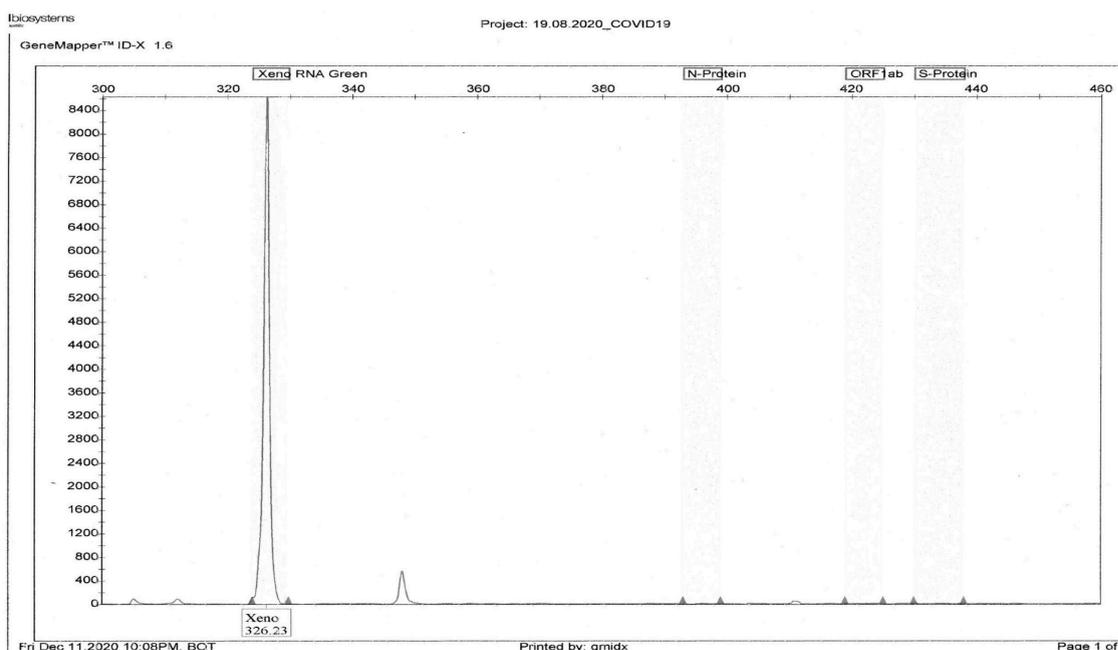


Figura 2. Resultado Negativo para COVID 19 por Múltiplex RT-PCR y Electroforesis Capilar donde no se visualiza ninguno de los picos de los 3 genes del virus SARS CoV-2, pero si se visualizó el pico del control endógeno interno ((XENO™ RNA CPI).

Validación de la Técnica Multiplex PCR y Electroforesis Capilar

Con los resultados obtenidos se determinó las características de desempeño de la técnica de Multiplex RT-PCR y Electroforesis Capilar, priorizando los parámetros de sensibilidad, especificidad, selectividad, eficiencia y precisión de la técnica respecto a la RT- PCR en Tiempo Real tomada esta última como prueba “Gold Standard”. Se realizaron cálculos estadísticos sobre la base de las fórmulas descritas en la Tabla 5.

Tabla 5. Fórmulas para determinar las características de desempeño.

<u>Característica de desempeño</u>	<u>Cálculo</u>
Tasa de falsos positivos	$c/(a+c)$
Tasa de falsos negativos	$b/(b+d)$
Especificidad	$d/(c+d)$
Sensibilidad	$a/(a+b)$
Selectividad	a/n
Eficiencia	$(a+d)/n$

RESULTADOS

De los 90 pacientes estudiados, 44 dieron positivo para SARS CoV-2 a la prueba RT-PCR en Tiempo Real 37 a la prueba Multiplex RT-PCR- EC. Se consideró una muestra positiva para RT-PCR en tiempo real, cuando el valor de CT era menor a 35 y una muestra positiva para Multiplex RT-PCR- EC, cuando al menos uno de los tres genes se expresaba en los electroferogramas.

a) Correlación de RT-PCR en Tiempo Real y Multiplex RT-PCR- EC.

Se identificaron 19 pacientes cuyos resultados presentaban curvas de amplificación PCR cercanas al umbral límite de positividad en la prueba RT-PCR en Tiempo Real dando valores de CT entre 29 y 35. De estos pacientes, 6 dieron resultados discordantes en relación a la prueba de Multiplex RT-PCR-EC, es decir fueron diagnosticados como positivos para RT-PCR en Tiempo Real y Negativos para Multiplex RT-PCR-EC. Además, hubo un paciente que con un valor de CT de 23,32 considerado positivo para RT-PCR en Tiempo Real, dio también un resultado negativo para Multiplex RT-PCR-EC (Tabla 6).

Tabla 6. Resultados de RT-PCR en Tiempo Real con valores cercanos al umbral de positividad y resultados discordantes con la técnica Multiplex RT-PCR- EC.

Nº	Código	RT-PCR en Tiempo Real	VALOR DE CT	Multiplex RT-PCR-EC	Discordancia de Técnicas
1	lgm/covid-19/8	positivo	23,32	negativo	discordante
2	lgm/covid-19/23	positivo	30,1	positivo	
3	lgm/covid-19/25	positivo	31,82	negativo	discordante
4	lgm/covid-19/26	positivo	29,69	negativo	discordante
5	lgm/covid-19/43	positivo	33	positivo	
6	lgm/covid-19/51	positivo	35	positivo	
7	lgm/covid-19/64	positivo	34.22	positivo	
8	lgm/covid-19/66	positivo	35	negativo	discordante
9	lgm/covid-19/67	positivo	33	positivo	
10	lgm/covid-19/70	positivo	33	negativo	discordante
11	lgm/covid-19/71	positivo	31	negativo	discordante
12	lgm/covid-19/76	positivo	32	negativo	discordante
13	lgm/covid-19/77	positivo	31	positivo	
14	lgm/covid-19/78	positivo	31	positivo	
15	lgm/covid-19/79	positivo	35	positivo	
16	lgm/covid-19/83	positivo	33	positivo	
17	lgm/covid-19/84	positivo	30	positivo	
18	lgm/covid-19/86	positivo	33	positivo	
19	lgm/covid-19/88	positivo	33	positivo	
20	lgm/covid-19/90	positivo	33	positivo	

b) Validación de la prueba Multiplex RT-PCR-EC

Para validar la detección de SARS CoV-2 por Multiplex RT-PCR-EC, al tratarse de un método cualitativo, donde se determina la presencia o ausencia del material genético del virus en la muestra, se re-analizaron las muestras de resultado conocido y controles positivos que se compararon en una matriz para hallar las tasas de verdaderos positivos, verdaderos negativos, falsos negativos y falsos positivos (Figura 3).

N°	Nivel Negativo			Nivel 1 Limite de Detección			Nivel 2 Limite de Detección			Nivel 3 Limite de Detección			Nivel Validación			Nivel Validación			Nivel Precisión			Nivel Precisión		
	YC		MC	2 ng/uL		2 ng/uL	1 ng/uL		1 ng/uL	0.5 ng/uL		0.5 ng/uL	YC		MC	MCh		MC	YC		MC	YC		MC
	EC	RT-Lo	Confirmad	EC	RT-Lo	Confirmad	EC	RT-Lo	Confirmad	EC	RT-Lo	Confirmad	EC	RT-Lo	Confirmad	EC	RT-Lo	Confirmad	EC	RT-Lo	Confirmad	EC	RT-Lo	Confirmad
	Presuntivo	Confirmad	Categoría	Presuntivo	Confirmad	Categoría	Presuntivo	Confirmad	Categoría	Presuntivo	Confirmad	Categoría	Presuntivo	Confirmad	Categoría	Presuntivo	Confirmad	Categoría	Presuntivo	Confirmad	Categoría	Presuntivo	Confirmad	Categoría
1	-	-	d	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a
2	-	-	d	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a
3	-	-	d	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a
4	-	-	d	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a
5	-	-	d	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a
6	-	-	d										+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a
7	-	-	d										+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a
8	-	-	d										+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a
9	-	-	d										+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a
10	-	-	d										+	+	a	-	+	c	+	+	a	+	+	a

Figura 3. Matriz para detectar resultados verdaderos positivos (a), verdaderos negativos (d), falsos positivos (c) y falsos negativos (b); n=total de muestras.

Para realizar el calculo de tasas de verdaderos positivos y verdaderos negativos se estructuró las tablas de presuntos verdaderos y falsos y precisión relativa en el marco de los parámetros de desempeño. Además, se hizo una correlación de estos datos (Tablas 7, 8 y 9).

Tabla 7. Cálculo de los presuntos verdaderos y falsos / Parámetros de desempeño.

Categoría		Total
Verdaderos positivos	a	34
Falsos negativos	b	0
Falsos positivos	c	1
Verdaderos negativ.	d	10
Total		45

		Resultados presuntivos		
		+	-	
Resultados confirmados	+	34	0	34
	-	1	10	11
		35	10	45

Tabla 8. Cálculo de la precisión relativa / Parámetros de desempeño.

Categoría		Total
Verdaderos positivos	a	20
Falsos negativos	b	0
Falsos positivos	c	0
Verdaderos negativos	d	0
Total		20

		Resultados presuntivos		
		+	-	
Resultados confirmados	+	20	0	20
	-	0	0	0
		20	0	20

Tabla 9. Correlación de datos, donde a = verdaderos positivos, b = falsos negativos, c = falsos positivos, d = verdaderos negativos y n = total (muestras + controles).

		Recuento presuntivo		
		+	-	
Recuento confirmado	+	a	B	a + b
	-	c	D	c + d
		a + c	b + d	N

c) Características de desempeño en la detección de SARS-CoV-2

Las características de desempeño de la técnica Multiplex RT-PCR-EC comparados con la técnica de RT-PCR en Tiempo Real, como técnica Gold Estándar, se resumen en la Tabla 10.

Tabla 10. Parámetros de desempeño de la técnica Multiplex RT-PCR-EC.

Parámetro	Resultado	Criterio de Evaluación	Evaluación
Tasa de falsos positivos	3%	NA	La tasa de falsos positivos es 3 %
Tasa de falsos negativos	0%	NA	La tasa de falsos negativos es 0 %
Sensibilidad	100%	≥ 90%	El método es sensible en un 100 %, detecta ARN de SARS-Cov-2 a partir de 0.5 ng/uL
Especificidad	91%	≥ 90%	El método es específico en un 91%, cumple el requisito
Selectividad	97.6%	> 10%	El método tiene una selectividad mayor al 10%, cumple el requisito
Eficiencia (Exactitud Relativa)	98%	≥ 95%	Las concentraciones de ARN de SARS-CoV-2 correctamente asignadas en la cuantificación presuntiva es del 98 %
Precisión relativa (repetibilidad / precisión intermedia)	100%	≥ 95%	La repetibilidad de un analista y precisión entre analistas es del 100%

*NA= No Aplica

a) Tasa de falsos positivos

La tasa de falsos positivos detectada en la prueba Multiplex RT-PCR-EC para la detección de ARN viral de SARS CoV-2 es 3 %, según la cantidad de muestras que fueron analizadas significa que puede ser asignado un caso como falso positivo; sin embargo, esto puede darse no necesariamente porque el método no es confiable, sino porque pudo haber ocurrido algún evento aleatorio que haya interferido en el proceso.

b) Tasa de falsos negativos

La tasa de falsos negativos detectada en la prueba es 0 %, estos resultados nos permiten mencionar que el método en proceso de validación es específico porque tiene la capacidad de detectar lo que se busca sin confundirlo con algún componente de la matriz que se analiza o contaminación del medio en el cual se realiza la prueba.

c) Sensibilidad

El método es sensible en un 100 %, permite la detección de ARN viral de SARS-CoV-2 a partir de 0.5 ng/uL. Según los parámetros de concentración establecidos, el equipo detecta con alta confiabilidad y sin problemas la presencia del virus, pese a que pueda coexistir en la muestra un extracto de ARN humano que pudo ser obtenido en el proceso de extracción del material genético (ARN). Asimismo, el equipo utilizado para esta metodología (analizador genético ABI 3500) responde adecuadamente en la emisión de señal respecto a los cambios de concentración del material genético (ARN) en la muestra.

d) Especificidad

El método es específico en un 91%, por tanto la prueba cumple el requisito de especificidad, es decir la capacidad de poder detectar los verdaderos negativos, en las muestra analizadas de pacientes realmente sanos, en el caso de la prueba de detección Multiplex

RT-PCR-EC, nos permite evaluar que realmente no existe presencia de ARN de SARS CoV-2 en la muestra analizada. La especificidad obtenida del 91%, indica que se produce una respuesta adecuada del método respecto a la capacidad de detectar los verdaderos negativos.

e) Selectividad

La selectividad para la prueba Multiplex RT-PCR-EC fue de un 97%. Estos resultados nos indican que la prueba Multiplex RT-PCR-EC es selectiva y dentro de la matriz que se analiza, que en este caso es una muestra de hisopado nasofaríngeo. No existen elementos significativos como para que la prueba no sea capaz de detectar puede detectar el ARN viral de SARS CoV-2 en una muestra.

f) Eficiencia (Exactitud relativa)

El 98% de las veces el resultado de la prueba Multiplex RT-PCR-EC, es correctamente asignado al resultado confirmatorio, es decir al “Gold Standard” que en este caso es la prueba de RT-PCR en Tiempo Real.

g) Precisión relativa (Repetibilidad/precisión intermedia)

La precisión obtenida del 100% indica que las influencias aleatorias como el medio ambiente y cambio de operador o analista no influyen en los resultados. Estos resultados se obtuvieron a partir de diferentes ensayos realizados por dos analistas diferentes, capacitados en el desarrollo de la prueba Multiplex RT-PCR-EC, en diferentes días y condiciones ambientales.

DISCUSIÓN

Durante la pandemia de COVID 19, la única manera de combatir al virus, es limitar su propagación, lo que solo es posible si las personas afectadas son detectadas y separadas lo antes posible. La detección de SARS-CoV-2 en muestras de pacientes es una herramienta crítica para monitorear la propagación de la enfermedad, guiar las decisiones terapéuticas y diseñar protocolos de distanciamiento social. Si esta detección es rápida y eficiente es una de las formas más eficaces de prevenir su distribución y reducir los estragos causados por este virus [18].

El mundo científico de hoy se enfrenta a un enorme desafío: cómo desarrollar nuevos métodos de identificación de patógenos que sean rápidos, baratos y fáciles de usar, así como precisos y reproducibles. El rápido desarrollo de la biología molecular ha permitido el uso de una herramienta de diagnóstico más precisa, que es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [19]. Una versión cuantitativa de esta, es el PCR en tiempo real. La detección de ácidos nucleicos virales amplificados en PCR cuantitativo se realiza con sondas fluorescentes específicas que incluyen una pequeña secuencia de nucleótidos asociada al indicador fluorescente [20].

La primera técnica recomendada para su diagnóstico por el CDC de China fue la RT-PCR en tiempo real que conlleva una previa retrotranscripción. Esta técnica es muy utilizada durante la actual pandemia de COVID-19 [21]. La técnica es muy sensible, ya que cualquier impureza derivada de la muestra clínica puede inhibir la Taq polimerasa y dar lugar a resultados falsos negativos [22]. . Es aún más esencial para los virus que contienen ARN, donde la identificación comienza con la retrotranscripción del ARN al ADN mediante transcripción inversa. Se demostró que la alta concentración de ARN viral en la muestra puede inhibir la transcripción inversa-PCR [23]. Esta podría ser la razón de los resultados falsos negativos del SARS-CoV-2 con la prueba de RT- PCR en tiempo real en los pacientes con síntomas clínicos de COVID-19, como lo demostraron Li y otros [24]. Las estadísticas recogidas en la sección haitiana de Beijing del Tercer Hospital de la Universidad de Pekín

del 21 al 31 de enero de 2020 muestran que aproximadamente el 20% de las pruebas fueron falsas negativas [24].

La electroforesis capilar (EC) es una herramienta de separación de biomoléculas, que en los últimos años ha tenido gran importancia en medicina [25] [26]. La información acumulada gracias a la EC comienza a vislumbrar las causas genéticas de muchas enfermedades, fortaleciendo el diagnóstico y reemplazando muchas de las metodologías clásicas para el estudio de la medicina genómica [27].

Usualmente el análisis de los diferentes analitos puede realizarse en unos minutos; se requiere de pequeñas cantidades de muestra, en el rango de nanolitros, con una alta reproducibilidad, y con un error estándar relativo de tiempo de migración menor a 0,5%. [28].

Estas características hacen de la EC un método eficiente y económico con capacidad de separar cientos de componentes de forma simultánea, empleando mínimas cantidades de muestras y reactivos, razones suficientes para ser una herramienta de elección para la identificación de SARS COV-2.

La identificación de SARS-Cov-2 en el presente trabajo, amplificando secuencias de los genes S, N y ORF1ab por un multiplex RT-PCR, seguido de una electroforesis capilar, ha resultado ser un método selectivo en un 97%, específico en un 91% y sensible en un 100%. Además, de haber mostrado una eficiencia del 98% y una precisión del 100%, que indica que las influencias aleatorias como el medio ambiente y cambio de operador o analista no influyen en los resultados.

La prueba Multiplex RT PCR EC optimizada en el presente estudio, ha permitido identificar resultados falsos positivos de COVID 19 diagnosticados con RT-PCR en tiempo real en un 16% de los pacientes incluidos en la investigación. Estos pacientes presentaban un CT cercanos al umbral de positividad. Estos hechos se pueden dar con frecuencia en los laboratorios de biología molecular cuando el analista obtiene resultados cercanos al umbral de positividad, generando una incertidumbre al momento de reportar el resultado.

La finalidad de este estudio no ha sido sustituir la técnica de RT-PCR en tiempo real que es la prueba gold standar, sino desarrollar una alternativa para facilitar el análisis cuando, por un lado, la demanda de pruebas de COVID-19 excediera la capacidad de la PCR [15] y por otro, cuando se genere una incertidumbre en el valor de CT obtenido por RT-PCR en tiempo real.

El acoplamiento de los métodos estándar de PCR con la electroforesis capilar parece ser una herramienta muy poderosa para superar los límites impuestos a muchos laboratorios por los requisitos de PCR y así aumentar la capacidad de ensayo[16].

Las limitaciones de las tecnologías de PCR, ponen de relieve los desafíos futuros de investigación y desarrollo para permitir un diagnóstico oportuno, rápido, de bajo costo y preciso de las enfermedades infecciosas emergentes.

CONCLUSIONES

1. Se identificaron pacientes con resultados con un valor de CT cercano al umbral límite de positividad en la prueba RT-PCR en Tiempo Real, los mismos que, en un 80% dieron resultados discordantes, es decir positivos para RT-PCR en Tiempo Real y negativos para Multiplex RT-PCR-EC.

2. La prueba Multiplex RT-PCR-EC para la identificación de SARS CoV-2 fue optimizada de manera muy eficiente y rápida, toda vez que esta técnica utiliza reactivos exclusivos aptos para procesar en un sistema automatizado y emitir resultados confiables.

3. Los resultados obtenidos en el proceso de validación de la prueba Multiplex RT-PCR-EC en relación a la prueba de RT-PCR en Tiempo Real, muestra que es un método selectivo en un 97%, específico en un 91% y sensible en un 100%.

4. Estos resultados han permitido ofrecer servicios de diagnóstico molecular de COVID 19 a la sociedad en general, a través de la prueba “Multiplex RT-PCR-EC”, la misma que ha sido autorizada por el Servicio Departamental de Salud de La Paz (SEDES) y la Universidad Mayor de San Andrés.

5. Los médicos tratantes de pacientes con COVID 19, después de conocer las ventajas de la prueba “Multiplex RT-PCR-EC” han asumido con responsabilidad que esta prueba es muy útil en aquellos casos en los que las otras pruebas no les orienta claramente en el diagnóstico definitivo.

Bibliografía

- [1] Liu R, Fu A, Deng Z, Li Y, Liu T. Promising methods for detection of novel coronavirus SARS-CoV-2. *View*. 2020; 1(1):e4.
- [2] Park G-S, Ku K, Baek S-H, Kim S-J, Kim SI, Kim B-T, et al. Development of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays Targeting Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *J Mol Diagn* 2020; 22:729–35. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2020.03.006>.
- [3] Shen M, Zhou Y, Ye J, Abdullah AL-maskri AA, Kang Y, Zeng S, et al. Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus. *J Pharm Anal* 2020; 10:97–101. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.02.010>.
- [4] Afzal Adeel. Molecular diagnostic technologies for COVID-19: Limitations and challenges. *J Advanced Research* 2020;26: 149-159.
- [5] Ulloa S, Bravo C, Parra B, Ramirez E, Acevedo A, Fasce R, et al. A simple method for SARS-CoV-2 detection by rRT-PCR without the use of a commercial RNA extraction kit. *Journal of virological methods*. 2020; 285:113960. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113960> PMID: 32835738.
- [6] Kudo E, Israelow B, Vogels CB, Lu P, Wyllie AL, Tokuyama M, et al. Detection of SARS-CoV-2 RNA by multiplex RT-qPCR. *PLoS Biology*. 2020; 18(10):e3000867. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000867> PMID: 33027248.
- [7] Broughton JP, Deng X, Yu G, Fasching CL, Servellita V, Singh J, et al. CRISPR–Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nature biotechnology*. 2020; 38(7):870–4. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0513-4> PMID: 32300245..
- [8] Ali Z, Aman R, Mahas A, Rao GS, Tehseen M, Marsic T, et al. iSCAN: An RT-LAMP-coupled CRISPR- Cas12 module for rapid, sensitive detection of SARS-CoV-2. *Virus research*. 2020; 288:198129. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198129> PMID: 32822689.
- [9] Yoshimi K, Takeshita K, Yamayoshi S, Shibumura S, Yamauchi Y, Yamamoto M, et al. Rapid and accurate detection of novel coronavirus SARS-CoV-2 using CRISPR-Cas3. *MedRxiv*. <https://doi.org/10.2139/ssrn.3640844>.
- [10] Chen Z, Zhang Z, Zhai X, Li Y, Lin L, Zhao H, et al. Rapid and sensitive detection of anti-SARS-CoV-2 IgG, using lanthanide-doped nanoparticles-based lateral flow immunoassay. *Analytical chemistry*. 2020; 92(10):7226–31. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00784> PMID: 32323974.
- [11] Kasetsirikul S, Umer M, Soda N, Sreejith KR, Shiddiky MJ, Nguyen NT. Detection of the SARS-CoV-2 humanized antibody with paper-based ELISA. *Analyst*. 2020; 145(23):7680–6. <https://doi.org/10.1039/d0an01609h> PMID: 32975254.
- [12] Joung J, Ladha A, Saito M, Kim NG, Woolley AE, Segel M, et al. Detection of SARS-CoV-2 with SHER-LOCK one-pot testing. *New England Journal of Medicine*. 2020; 383(15):1492–4.
- [13] Chen Z, Wu Q, Chen J, Ni X, Dai J. A DNA aptamer based method for detection of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *Virologica Sinica*. 2020; 35:351–4. <https://doi.org/10.1007/s12250-020-00236-z> PMID: 32451881.
- [14] Jang WS, Lim DH, Yoon J, Kim A, Lim M, Nam J, et al. Development of a multiplex Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) assay for on-site diagnosis of SARS CoV-2. *PloS one*. 2021; 16(3): e0248042. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248042> PMID: 33657176.
- [15] Gómez J, Melón S, Boga J, Alvarez M, Rojo S, Leal A, Castello C, Alvarez V, Cuesta E, Coto E. Capillary electrophoresis of PCR fragments with 5'-labelled primers for testing the SARS-Cov-2. *J Virol Methods* 2020; 10; 284: 113937.
- [16] Bogusław Buszewski,a,b,* Ewelina Maślak,a,b Michał Złoch,a Viorica Railean-Plugaru,a Ewa Kłodzińska,c and Paweł Pomastowski. A new approach to identifying pathogens, with particular regard to viruses, based on capillary electrophoresis and other analytical techniques. *Trends Analyt Chem*. 2021 Jun; 139: 116250.
- [17] Guía para el manejo del COVID-19. Versión Mayo 2020, Ministerio e Salud y Deportes, Estado Plurinacional de Bolivia.

- [18]. Law S., Leung A.W., Xu C. Severe acute respiratory syndrome (SARS) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): from causes to preventions in Hong Kong. *Int. J. Infect. Dis.* 2020;94:156–163. doi: 10.1016/j.ijid.2020.03.059. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
- [19]. Adzitey F., Huda N., Ali G.R.R. Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and application to foodborne pathogens isolated from ducks. *Biotech.* 2013;3:97–107. doi: 10.1007/s13205-012-0074-4. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
- [20]. Buszewski B., Rogowska A., Pomastowski P., Zloch M., Railean-Plugaru V. Identification of microorganisms by modern analytical techniques. *J. AOAC Int.* 2017;100:1607–1623. doi: 10.5740/jaoacint.17-0207. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
- [21] Corman V. M., Landt O., Kaiser M., Molenkamp R., Meijer A., Chu D. K. W., et al. (2020). Detection of 2019 Novel Coronavirus (NCoV) by Real-Time RT-PCR. *Eurosurveillance* 25 (3). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045
- [22]. Bergallo M., Costa C., Gribaudo G., Tarallo S., Baro S., Ponzi A.N., Cavallo R. Evaluation of six methods for extraction and purification of viral DNA from urine and serum samples. *New Microbiol.* 2006;29:111–119. [PubMed] [Google Scholar]
- [23]. Drosten C., Panning M., Guenther S., Schmitz H. False-negative results of PCR assay with plasma of patients with severe viral hemorrhagic fever [2]. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40:4394–4395. doi: 10.1128/JCM.40.11.4394-4395.2002. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
- [24]. Li D., Wang D., Dong J., Wang N., Huang H., Xu H., Xia C. False-negative results of real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2: role of deep-learning-based ct diagnosis and insights from two cases. *Korean J. Radiol.* 2020;21:505–508. doi: 10.3348/kjr.2020.0146. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
- [25] García-canas V, Cifuentes A. Detection of microbial food contaminants and their products by capillary electromigration techniques. *Electrophoresis* 2007; 28: 4013-30.
- [26] Martínez-Gómez MA, Carril-Aviles MM, Sagrado S, Villanueva-Camanas RM, Medina-Hernández MJ. Characterization of antihistamine-human serum protein interactions by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 2007; 1147: 261-9.
- [27] Liu X, Dahdouh F, Salgado M, Gómez FA. Recent advances in affinity capillary electrophoresis (2007). *J Pharm Sci* 2009; 98: 394-410.
- [28] Jonathan J Magaña^{1,2,a}, María de la Luz Arenas-Sordo^{1,b}, Rocío Gómez^{1,3,c}. La electroforesis capilar como una nueva estrategia en la medicina y el diagnóstico clínico *Rev Méd Chile* 2009; 137: 946-956 (Revista Médica de Chile).



LIBRO DE RESÚMENES DE LAS JORNADAS DE ACTUALIZACIÓN EN VIROSIS CON POTENCIAL EPIDÉMICO DE IMPORTANCIA REGIONAL Y II REUNIÓN ANUAL DE COVIREDCYTED, REALIZADAS EN EL INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS “DR. MANUEL MARTÍNEZ BÁEZ”, DIRECCIÓN GENERAL DE EPIDEMIOLOGÍA, MINISTERIO DE SALUD, MÉXICO, NOVIEMBRE 2023

--

**DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES
BERNAL, ARGENTINA, NOVIEMBRE 2024**

DISEÑO Y COMPILACIÓN: Sandra Goñi y Mercedes Pastorini