UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTIN
INEI -ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"
Maestría en Microbiología Molecular

INVESTIGACIÓN DE VIRUS OROPOUCHE POR RT-PCR DESDE NOVIEMBRE DEL 2009 A ENERO DEL 2011 EN LA PROVINCIA DE JUJUY.

Tesis de maestría presentada por

Bioq. Ariel D. Fridman

Bajo la dirección de la Dra. Andrea M. Mangano y la codirección de la Dra. María Alejandra Morales

Buenos Aires 2014

INVESTIGACIÓN DE VIRUS OROPOUCHE POR RT-PCR DESDE NOVIEMBRE DEL 2009 A ENERO DEL 2011 EN LA PROVINCIA DE JUJUY.

Tesis de maestría presentada por

Bioq. Ariel D. Fridman

Director: Dra. Andrea M. M. Mangano

Codirector: Dra. María Alejandra Morales

Laboratorio Central de Salud Pública de la Provincia de Jujuy-
Laboratorio de Biología Molecular

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTIN

ANLIS "DR. CARLOS G. MALBRÁN"

Maestría en Microbiología Molecular

Epígrafe

“¿Qué es lo más difícil? Lo que parece más simple:
ver con los ojos lo que está delante de ellos”

Goethe.

Agradecimientos

- A mi esposa Gabi por su paciencia y compañía en todos los momentos.
- A mis hijos, Sofía y Matías que son la razón de todo en mi vida.
- A mis padres, Fernando y Zully por el apoyo en todos los emprendimientos, por locos que sean.
- A mi abuela Sara, sponsor oficial de esta maestría.
- A Andrea Mangano y Alejandra Morales (directora y codirectora) por el tiempo, consejos brindados y sobre todo la paciencia, es un lujo para mi haber compartido esta tesis con ellas.
- A la Dra. María de la Paz Bossio conjuntamente con la Dirección de docencia del Ministerio de Salud de la Provincia de Jujuy, por el apoyo.
- A la Dra. Cristina Ubeid, por permitir ausentarme del trabajo, para cursar la maestría.
- Al Dr. Miguel Charre y al laboratorio Samman Biología Molecular, por la ayuda dedicada, tanto durante el cursado como en la tesis de esta maestría.
- A las Dras. Laura Paredi y Evangelina Ortiz de la Dirección de bioquímica, por su apoyo en la búsqueda de antecedentes e información.
- Al Dr. Gustavo Macías por sus consejos en epidemiología.
- A la Lic. María Giardina, por su compañía en todas mis etapas de la vida.
- A la Dra. Liliana Neder del instituto de Biología de la Alturas de la UNJU, por su colaboración en los datos entomológicos provinciales.
- Al Dr. Gustavo Rúa por su ayuda en el procesamiento de gran parte de las muestras.
- A la Dra. Cintia Fabri al Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas (INEVH) “Dr. Julio I. Maiztegui”, por los controles, protocolos, consejos y reactivos cedidos.
- A la Dra. Elízabeth Vergara, de la Rioja, que alguna vez me dijo *“no hay trámite más largo que el que nunca se comienza…..”* cuando le comenté de mis intenciones en poder hacer algún día esta maestría.
- Y agradezco especialmente a la Dra Viviana Vater del hospital Oscar Orías (LGSM), a los profesionales del hospital Paterson (San Pedro), los profesionales de los hospitales que trabajaron y al personal del servicio de Virología del Laboratorio Central, sin su colaboración no hubiera podido realizar esta investigación.

Índice

1.Resumen	**5**
2.Problemática	**6**
3.Marco teórico	**8**
3.1.Virus Oropouche familia y clasificación serológica	**8**
3.2 Diagnóstico	**8**
3.3.Estrucutura	**9**
3.4.Ciclos de transmisión, reservorios y vectores	**11**
3.5. Aspectos clínicos	
3.6.Antecedentes y Distribución geográfica	**12**
3.7.Antecedentes en Argentina	**13**
3.8.Descripción del ámbito del estudio	**14**
3.9.Breve reseña de la organización del sistema de salud en la provincia de Jujuy	**17**
3.9.1 Síntesis de la organización de la red provincial de Dengue	**20**
3.10. Algoritmo de trabajo de la red de laboratorios y notificación de dengue a través del SIVILA	**20**
4.Objetivo	**24**
5.Materiales y métodos	**25**
5.1.Período de estudio	**25**
5.2.Origen de las muestras	**25**
5.3.Tipos de muestras	**26**
5.4.Criterio de selección de las muestras	**27**
5.5.Procesamiento de las muestras	**27**
5.6.Estudios de screening para dengue	**28**
5.6.1.Investigación de Antígeno NS1 por método de ELISA “Sandwich”	**28**
5.6.2. Evaluación de calidad de la muestra para estudios moleculares.	**29**
5.6.3.Investigación de material genético viral (ARN) por método de rt-PCR	**31**
5.7.Estudio de diagnóstico para OROV	**37**
5.7.1 Investigación de material genético viral (ARN) por método de rt-PCR	**37**
6.Resultados	**41**
6.1.Muestras estudiadas	**41**
6.2.Investigación de antígeno NS1	**43**
6.3.Análisis de la calidad de las muestras	**43**
6.4.Investigación virus Dengue, por rt-PCR multiplex modalidad anidada (nested) y RT-PCR	**44**
6.5.Resultados investigación virus Oropouche	**46**
7.Conclusiones	**47**
8. Bibliografía.	**51**
9. Anexos	**57**
9.1 Anexo 1 Aprobación del comité provincial de bioética	**57**
9.2 Anexo 2 Ficha Vigilancia de Síndromes Febriles	**58**
9.3 Anexo 3 Algoritmo de procesamiento y diagnóstico virus ORO	**59**

1. Resumen

El virus Oropouche (OROV) es causante de la llamada “fiebre de Oropouche“, enfermedad que produce un cuadro clínico similar al dengue pero más leve. Este virus transmitido por la picadura de un mosquito *Culicoides paraensis* presenta brotes anuales en regiones amazónicas donde cocircula con el virus dengue. En la provincia de Jujuy, en ciertas franjas del territorio provincial están dadas las condiciones ecológicas que posibilitarían la circulación de OROV, ya que en la denominada zona de las yungas, se encuentra el vector. En el año 2005 ya se evidenció la actividad de este arbovirus en nuestra provincia, a partir de muestras de cinco pacientes con síndromes febriles inespecíficos. Luego de ese hallazgo No se han vuelto a encontrar evidencias de circulación viral en la región. El objetivo de este estudio, fue investigar la circulación de OROV, utilizando como herramienta la técnica de rt-PCR modalidad anidada. Se estudiaron 160 sueros de muestras agudas tempranas (5 días desde el inicio de los síntomas) en pacientes con sintomatología compatible y que hayan resultado negativos en sus estudios previos para virus dengue, durante la campaña 2010-2011. No se obtuvieron resultados positivos en las muestras evaluadas, por lo que no se ha evidenciado circulación de OROV en casos con sintomatología clínica compatibles detectados en la provincia de Jujuy durante el período de estudio.

Palabras claves: Virus Oropouche, Virus Dengue, *Culicoides paraensis,* síndromes febriles inespecíficos.

2. Problemática

En base a los datos provistos por el Sistema Nacional de Vigilancia Laboratorial (SI.VI.LA) en el período comprendido entre el mes de noviembre del 2009 a enero del 2011, 724 casos fueron denunciados como sospechosos de dengue. Los mismos fueron investigados por los laboratorios de la red provincial, encontrando los siguientes resultados (tabla 1):

Tabla Nº1. Casos sospechosos de dengue estudiados por el laboratorio en el período de noviembre -2009 enero-2011. Fuente SI.VI.LA

Resultado de laboratorio	Nº de casos
Negativo	384
Positivo confirmado Virus Dengue (*Flavivirus flaviviridae*)	1
Positivo confirmado Virus Dengue (serotipo 1)	3
Dengue Probable	8
Dengue sospechoso-RESULTADO NO CONCLUSIVO	259
En estudio	68
Muestra no apta para el diagnóstico	1
Total	724

Observando estos datos podemos notar que existen al menos 384 casos de pacientes denunciados como síndromes febriles inespecíficos, en los cuales se sospecha de una infección por virus dengue, que resultan negativos para dicho virus. A demás tenemos en cuenta a aquellos 259 casos que presentan un resultado NO CONCLUSIVO, que son potenciales negativos, ya que presentan al menos un resultado negativo para dengue y no pudieron ser confirmados por no contar con una segunda muestra. Estas situaciones llevan a pensar que dichos pacientes podrían presentar algún tipo de infección por otro microorganismo, que presente una sintomatología similar a la infección por virus dengue.

La provincia de Jujuy consta de cuatro regiones geográficas diferentes, Puna, Quebrada, Valles y Yungas. En la región de las Yungas o ramal, la infección por virus dengue es endémica. Esta situación se debe principalmente a la presencia de un clima cálido, con veranos intensos y abundantes precipitaciones, que permiten el desarrollo de su vector, el *aedes aegypti,* un "mosquito" perteneciente a la familia Culicidae. Este clima también es propicio para el desarrollo de otros insectos dípteros que pueden funcionar como vectores virales. Es el caso de los pertenecientes al género Culicoides, más precisamente el *Culicoides paraensis*. Principal vector en la transmisión urbana

de virus Oropouche en las zonas endémicas del amazonas (1). En la provincia de Jujuy se sabe que el *Culicoides paraensis* se comporta como un vector secundario en la transmisión de un parásito nematodo, responsable de los casos de filariasis en la zona de las yungas jujeñas (2). Además de las mencionadas situaciones, en el año 2005 Fabbri y colaboradores evidenciaron la circulación de OROV en nuestra provincia (3).

El propósito de este estudio es investigar la etiología por OROV en síndromes febriles inespecíficos, que resultan negativos para virus dengue.

3. Marco teórico

3.1. Virus Oropouche familia y clasificación serológica

El OROV pertenece a la familia Bunyaviridae. Familia establecida en el año 1975 y constituida por 4 géneros que infectan animales (Orthobunyavirus, Phlebovirus, Nairovirus, Hantavirus) y un género cuyos miembros infectan plantas (Tospovirus) (4). La mayoría de los virus pertenecientes a esta familia son transmitidos por artrópodos principalmente mosquitos, garrapatas y flebotominos. Los Hantavirus son transmitidos por los aerosoles de las excretas de los roedores contaminados (5).

El OROV pertenece al género Orthobunyavirus. Serológicamente el género Orthobunyavirus presenta 18 serogrupos distintos (6). El OROV pertenece al serotipo Simbu, la clasificación de los virus pertenecientes a este grupo se realizó utilizando las técnicas de inhibición de la hemaglutinación, fijación de complemento y neutralización (7), dando origen a 5 complejos antigénicos: Simbu, Manzanilla, Oropouche, Thimiri y Nola. El OROV está incluido en complejo que lleva su nombre conjuntamente con los virus Utinga, Jatobal, Utive, Buttomwillow, Face's Paddock (4).

3.2 Diagnóstico

El diagnóstico de infección por OROV, consiste en el aislamiento viral, la detección del ARN viral, o detección de anticuerpos específicos en el suero del paciente. La elección de la técnica diagnóstica dependerá del tiempo en que fue tomada la muestra, respecto al inicio de síntomas del paciente. La muestra de elección en todos los casos es el suero fresco, tomado por punción venosa.

Cuando la muestra es tomada en la fase aguda de la infección, en el período que va desde el inicio de la sintomatología hasta los primeros 4 a 5 días de evolución, los métodos de elección serán el aislamiento viral, que puede ser realizado en ratones lactantes o en cultivos celulares en células VERO, o la investigación de ARN viral, para los cuales existen las técnicas de rt-PCR convencionales o también rt-PCR en Tiempo real (5).

Cuando la muestra sanguínea es tomada luego de los primeros 5 días de iniciado los síntomas, se deberá investigar la circulación de anticuerpos específicos. Para ello se cuenta con las técnicas de Inhibición de la hemaglutinación, test de neutralización o la investigación de Ig M por método de ELISA.

Hay que aclarar que no existe en el mercado un equipo comercial para la investigación de OROV, por lo que cualquiera que sea la técnica que se utilice para su estudio deberá ser del tipo casera (in-house).

En base a accesibilidad metodológica las técnicas más utilizadas para la investigación de OROV son:

- En infecciones agudas, de 0 a 5 días de evolución, rt-PCR convencional o rt-PCR de tiempo real.
- Luego de los 5 días de evolución la técnica de elección es ELISA de captura de IgM (Mac-ELISA).

3.3. Estructura

Se asume que las partículas virales de oropouche presentan la misma morfología que la observada en los demás orthobunyavirus, debido a que no existen estudios de microscopía electrónica en virus oropouche aislados de humanos que certifiquen su estructura. Los estudios de virus emparentados como el Virus La Crosse, muestran una partícula esférica de 80 a 110 nm de diámetro de tamaño, envuelta de una membrana lipídica, proveniente del Golgi y ocasionalmente de la membrana plasmática celular (6). En el interior de la partícula viral, el genoma se organiza en tres segmentos de ARN monocatenarios de diferentes tamaños (pequeño, mediano y grande), ligados a una proteína L, todo esto rodeado de una proteína N (nucleocápside) (8, 9) Figura Nº 1.

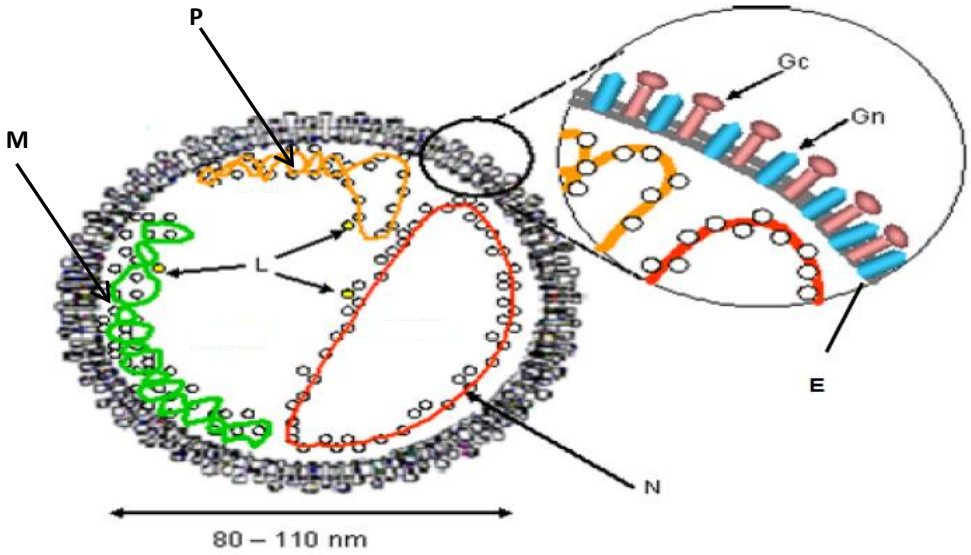


Figura 1. Representación esquemática de la partícula viral de un Orthobunyavirus. Donde se nota los tres segmentos de ARN (P, M y G) asociados a la proteína L. Circundando al ARN las proteínas N. En la envoltura (E) viral se observa las glicoproteínas Gg y Gn (10). Adaptado de Fauquet y col (4)

El ácido nucleico del OROV presenta tres segmentos de ARN simple hebra, con polaridad negativa de diferentes tamaños: el pequeño (P) de 754 nucleótidos, el medio (M) de 4385 nucleótidos y el grande (G) de 6846 nucleótidos (10, 11, 12, 13). Figura Nº 2.

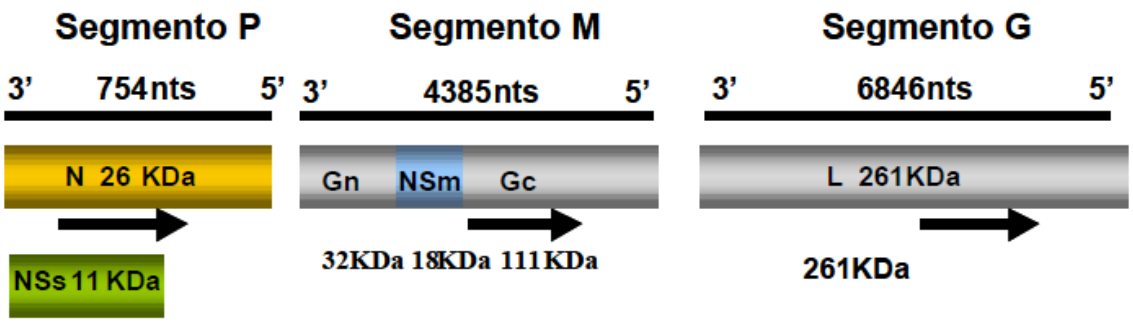


Figura 2. Organización genómica de OROV, ARNs genómicos representados en líneas finas. Los ARNm son representados por las flechas (las flechas indican el origen 3`del cebador hasta el extremo 5`). Los productos de los genes aparecen con sus tamaños en KDa. N: Nucleocápside; Gn y Gc: glicoproteínas de superficie; NSm, NSs: proteínas no estructurales; y L proteína estructural (9).

El segmento genómico G contiene, en un marco abierto de lectura, la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína L, una ARN polimerasa dependiente de ARN. El segmento genómico M codifica en un único marco abierto de lectura una gran poliproteína, que luego es escindida en las glicoproteínas de superficie Gc y Gn y en una proteína no estructural NSm (13). El segmento genómico P presenta dos marcos abiertos de lectura, que codifican para una proteína estructural del nucleocápside (N) que rodea cada uno de los segmentos de ARN genómico y una proteína no estructural llamada NSs (14).

En bases a la secuenciación total del gen N del segmento P, el OROV puede dividirse filogenéticamente en cuatro grupos I,II,III y IV (10, 15)

3.4. Ciclos de transmisión, reservorios y vectores.

El OROV es el más importante agente etiológico de una enfermedad humana vehiculizado por una especie de Ceratopogonidae. Se reconocen dos ciclos:

El ciclo silvestre, en el cual la infección transcurre de modo asintomático en perezosos, primates (en quienes el virus fue aislado), aves y roedores (en quienes se aislaron anticuerpos neutralizantes). Este ciclo es transmitido probablemente por los mosquitos (Culicidae) *Coquillettidia venezuelensis* y *Ochlerotatus serratus*, de los cuales fue aislado el virus (16).

El ciclo urbano, por otra parte, se manifiesta por epidemias que afectan al hombre, y las poblaciones de *Culicoides paraensis* ostentan una gran densidad durante las epidemias del virus ORO (17, 18). Además, *C. paraensis* resultó ser un vector eficiente en ensayos experimentales de transmisión a hámsters, y el hombre desarrolla una viremia de suficiente nivel como para infectar a los Culicoides y, a su vez, estos pueden retransmitir el virus al hámster (19; 20). El hombre se comportaría como un amplificador del virus en condiciones urbanas. La transmisión del OROV al hámster ha sido también demostrada utilizando el mosquito *Culex quinquefasciatus*, aunque este es mucho menos eficiente (21). Estos y otros estudios sugieren fuertemente que *C. paraensis* es el mayor vector biológico del OROV al hombre durante el transcurso de las epidemias urbanas. Figura Nº 3.

En cuanto a la posibilidad de encontrar dichos vectores en la provincia de Jujuy existen registros bibliográficos que informan de la presencia de *Coquillettidia venezuelensis, Ochlerotatus serratus* y *Culex quinquefasciatus* (22). Aunque no especifíca las regiones provinciales donde se encuentran. En el caso de *Culicoides paraensis*, existen registros de encontrarse en la zonas de la yunga, cerca de la ciudad de Fraile Pintado, perteneciente al departamento de Ledesma (2).

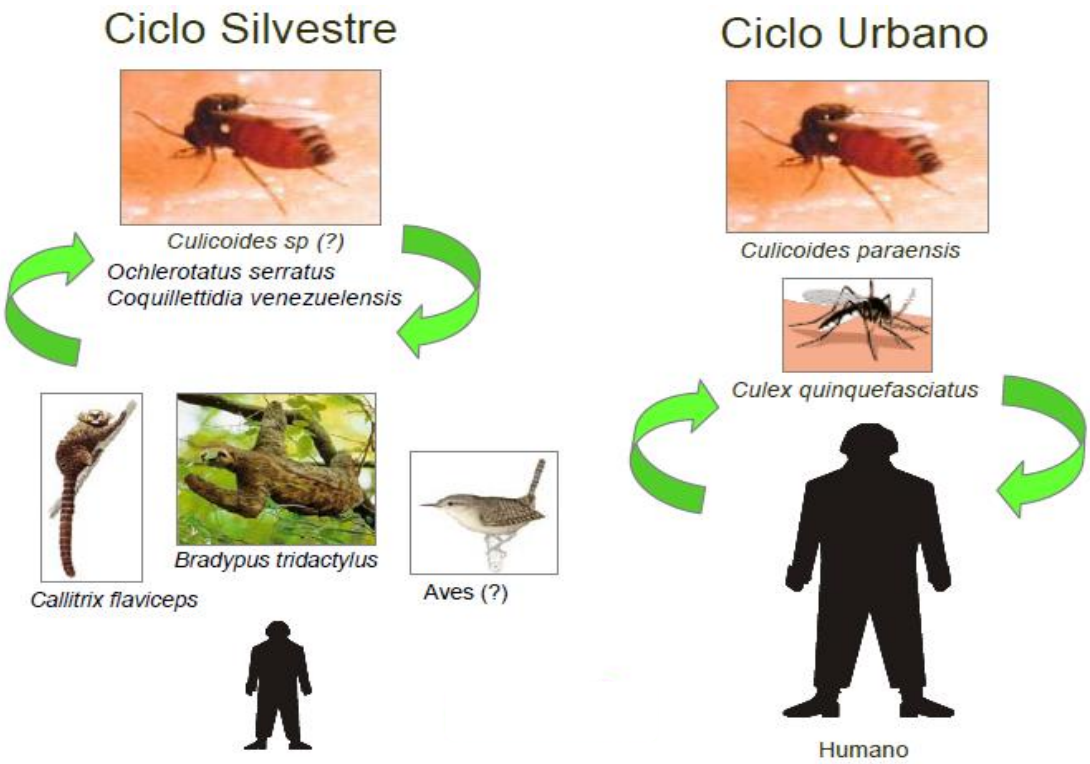


Figura Nº3. Ciclos de transmisión del OROV. "Silvestre y Urbano" Donde se describe los hospedadores y los vectores involucrados en cada ciclo.
Adaptado de Vasconcelos H. (10).

3.5. Aspectos clínicos

La fiebre Oropouche tiene un periodo de incubación que dura de cuatro a ocho días, la fase aguda inicia con una fiebre de comienzo brusco, mayor de 39°C, con síntomas similares a los observados en la fiebre del dengue, a menudo puede acompañarse de cefaleas, mialgias, artralgias y anorexia. Algunos pacientes también presentan nauseas, vómitos, dolor retro ocular, rash y escalofríos. Están descriptos además cuadros meníngeos. La recuperación de los enfermos es completa y no existen registros de casos fatales.

3.6. Antecedentes y Distribución geográfica

La fiebre oropouche, es una infección arboviral febril urbana, extendida por todo américa de sur, con más de 30 epidemias informadas en Latinoamérica desde 1960 a 2011 en los países de Brasil, Perú, Panamá, y Trinidad y Tobago (23). El virus se aisló por primera vez en 1955 en un paciente febril proveniente de Vega de Oropouche en Trinidad y Tobago y de un pool de mosquitos *Coquillettidia venezuelensis* (23). Luego se ha registrado

en numerosas localidades selváticas de *Brasil, Perú y* Panamá. En Brasil en 1960 se aisló el virus de un perezoso (*Bradypus tridactylus*) capturado cerca una zona boscosa durante la construcción de la autopista Belem-Brasilia y de un pool de mosquitos *Ochlerotatus serrato* capturado cerca del mismo sitio (24, 25).

En Brasil a partir del año 1962 se han registrado numerosos casos de infecciones por OROV y epidemias producidas por este virus en diferentes centros urbanos de los estados de Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Pará, Rondônia y Tocantins (26, 27). También se registraron epidemias en Perú, en 1992, en la ciudad de Iquitos del departamento Loreto (25). Los últimos brotes de OROV registrados en Perú fueron en el año 2010 y 2011 en el pueblo de Bagazán Departamento San Martin en la selva peruana (28) y localidades de La Esperanza y Casablanca del distrito de Pimpingos de la provincia de Cutervo en la región Cajamarca respectivamente (29). Existen otros países de américa del sur donde se evidenció la de circulación de OROV como Ecuador (30) y las regiones Bolivianas de Santa Cruz de la Sierra y Cochabamba. (31)

3.7. Antecedentes en Argentina

En un estudio realizado durante el período comprendido entre 10/2002 a 05/2003, sobre 132 muestras de pacientes con síndromes febriles inespecíficos o clínica compatible con dengue, de diferentes puntos de Argentina (Buenos Aires, Córdoba, Corrientes, Formosa, Jujuy, Salta, Tucumán y Santa Fé), donde todos los sueros presentaban serología negativa para virus dengue, por la técnica de Mac-ELISA, fueron analizadas, en el instituto Maiztegui (INEVH) por medio de un Mac-ELISA (implementado en el CNR con reactivos cedidos por el Dr. Vasconcelos del Instituto Evandro Chagas, de Belem, Brasil), con antígenos específicos para OROV. Encontrándose como resultado 8 sueros de pacientes reactivos para virus ORO. Los resultados y la distribución por provincias se presentan en la tabla Nº2

Tabla Nº2. Antecedentes de estudios serológicos de OROV en Argentina.

Provincia	Positivos/Estudiados*(%)	Localidad (Nº muestras positivas)
Buenos Aires	0/3(0%)	
Córdoba	0/3(0%)	
Corrientes	0/2(0%)	
Formosa	2/7(28%)	Clorinda (2)
Jujuy	**3/49(6,1%)**	**Yuto (1) Palma sola (1) San Pedro (1)**
Salta	3/62(4,4%)	Orán (2) Salvador Mazza (1)
Santa Fe	0/11(0%)	
Tucumán	0/1(0%)	

Técnica utilizada Mac-ELISA.

Estos resultados preliminares permitieron evidenciar, serológicamente, la presencia de OROV en la región norte de Argentina (32). Luego en el año 2005, Fabbri y colaboradores, detectaron, por la técnica de rt-PCR, 5 muestras positivas a partir de 10 sueros provenientes de pacientes con menos de 5 días de evolución, los cuales presentaban síndromes febriles inespecíficos o clínica compatible con dengue. Todas las muestras fueron negativas cuando se intentó un aislamiento de virus dengue, las mismas provenían de la provincia de Jujuy, y fueron tomadas durante el período de tiempo comprendido entre los meses de Enero a Mayo del año 2005.

A partir de las mencionadas muestras positivas, se pudo secuenciar el gen N completo del OROV, demostrando la existencia de un grupo filogenético distinto provisionalmente denominado genotipo IV. (3).

Luego de este hallazgo no se ha vuelto a confirmar la circulación de OROV en nuestro país.

3.8. Descripción del ámbito del estudio

La provincia de Jujuy está ubicada en el extremo norte de la Región Noroeste de la República Argentina. Comprende entre los 21°46´ y los 24°37´ de latitud sur, y entre los 64°9´ y los 67°13´ de longitud oeste.

Ocupa una extensión de 53.219 km2, lo que representa 3% del área continental Argentina.

Al norte tiene 312 km de frontera con la República de Bolivia, en tanto hacia al oeste 130 Km fronterizos con la República de Chile. En cuanto a su límite este y sur, Jujuy limita con la provincia de Salta.

Su territorio queda atravesado por el trópico de Capricornio y forma parte de la región del noroeste del pais. La división político-administrativa comprende 16 departamentos: Cochinoca, Dr. Mauel Belgrano, El Carmen, Humahuaca, Ledesma, Palpala, Rinconada, San Antonio, San Pedro, Santa Barbara, Santa Catalina, Susques, Tilcara, Tumbaya, Valle Grande y Yavi.

La capital se llama San Salvador de Jujuy y está ubicada en el departamento Dr. Manuel Belgrano.

Según datos del censo nacional del año 2010, la provincia de Jujuy presenta una población total de 672.260 habitantes.

La provincia de Jujuy exhibe cuatro regiones geográficas, que presentan grandes diferencias en sus climas, flora y fauna.

Región de Valles: es la región más llana y comprende el área sur de la Provincia de Jujuy. El relieve predominante son los valles, pero existen también algunas manifestaciones montañosas importantes, que culminan en la máxima altura de Jujuy: El Cerro Chañi, de 5.896 m.s.n.m. Su clima templado, presenta una temperatura máxima media de 24,7ºC y promedia una mínima de 11,0ºC con una amplitud térmica anual de 13,0ºC (33), esto hace que sea la zona más poblada y explotada. El promedio de precipitaciones anuales es de aproximadamente 1100 mm, siendo mayor en el período que va de diciembre a marzo (33). El Río Grande y sus afluentes favorecen la agricultura, y varios diques forman importantes espejos de agua, aptos para el riego de grandes áreas agrícolas.

La región de los Valles se extiende por los departamentos Dr. Manuel Belgrano, Palpalá, El Carmen y San Antonio. Entre sus llanuras y grandes extensiones con poca pendiente; existen también algunas elevaciones importantes como Zapla, Tilquiza, León, Reyes, Guerrero o La Almona.

Región de las Yungas o Selva: Las Yungas cubren el sector oriental de Jujuy y es la zona más baja de la Provincia, aunque cuenta con relieves de diferentes alturas. Su clima es cálido, con veranos intensos presenta una temperatura máxima media de 30,4ºC y promedia una mínima de 15,5ºC con una amplitud térmica anual de 14,9ºC (33), además abundantes precipitaciones que forman una red hidrográfica de importancia. La vegetación es exuberante y contiene una gran riqueza forestal.

Las Yungas también poseen la mayor reserva de fauna de Jujuy. La economía de la región es favorecida por la producción agrícola (caña de azúcar, cítricos y hortalizas) y las industrias asociadas: Ingenios azucareros (Ledesma, La Esperanza) que elaboran azúcar, alcohol y papel; fábricas de concentrados cítricos, y gran cantidad de aserraderos. Esta zona forma parte de las Selvas Subtropicales de Montaña, o Selvas Nubladas, que se

distribuyen como una estrecha faja sobre el costado oriental de los Andes, desde Venezuela hasta la provincia argentina de Catamarca. En Jujuy abarca desde la Cordillera Oriental hasta las Sierras Subandinas, entre los 400 y los 3.000 m.s.n.m. Esta región, uno de los ecosistemas con más alta biodiversidad de Argentina, está cruzada por numerosas serranías que interceptan los vientos húmedos del Atlántico y condensan la humedad en forma de lluvia y neblina. Las lluvias, concentradas mayormente entre noviembre y abril, van desde los 1.000 hasta los 3.000 mm. Anuales, y en la estación seca (mayo a octubre), se produce un fenómeno de precipitación horizontal, resultado de la condensación de la neblina sobre las copas de los árboles, que suma entre 300 y 900 mm. al año.

En la región de la Yungas se encuentran los departamentos de San Pedro, Santa Bárbara, Valle Grande, Ledesma

Región de la Quebrada: abarca la zona central de la Provincia de Jujuy. Posee un clima seco, frio y ventoso y constituye una faja de transición hacia la Puna con una temperatura máxima anual de 22,9ºC y una mínima de 2,9ºC (33). La vegetación es escasa. El clima es cálido y seco; las escasas lluvias estivales que promedian los 200 mm, la intensa radiación solar, los fuertes vientos y el inclinado relieve provocan una erosión natural que limita el desarrollo de la flora.

En esta región están los departamentos de Humahuaca, Tilcara y Tumbaya.

Región de la Puna: es una inmensa meseta que se extiende al Norte y Oeste de la Provincia de Jujuy, recorrida por cordones montañosos de una altura promedio superior a los 3.800 m.s.n.m. El clima es frío y seco, y presenta una gran amplitud térmica, con un promedio de temperatura máxima de 22,5 ºC y una mínima que media los 0,9ºC. Las escasas lluvias son estivales y se manifiestan de manera torrencial, con registros de 200 a 400 mm. Anuales.

Los departamentos que lo componen son: Cochinoca, Rinconada, Santa Catalina, Susques y Yavi.

En la figura Nº3 se observa la distribución de las diferentes regiones geográficas de la provincia.

Figura Nº 3. Mapa político de la provincia de Jujuy, con sus cuatros regiones geográficas. VALLES, YUNGAS, QUEBRADA Y PUNA.
Fuente: Secretaría de turismo de la provincia de Jujuy.

3.9. Breve reseña de la organización del sistema de salud en la provincia de Jujuy

El sistema de salud provincial sectoriza la provincia en cinco grandes zonas, teniendo en cuenta accesibilidad, población, características geográficas, demográficas, pautas culturales (34) figura Nº4

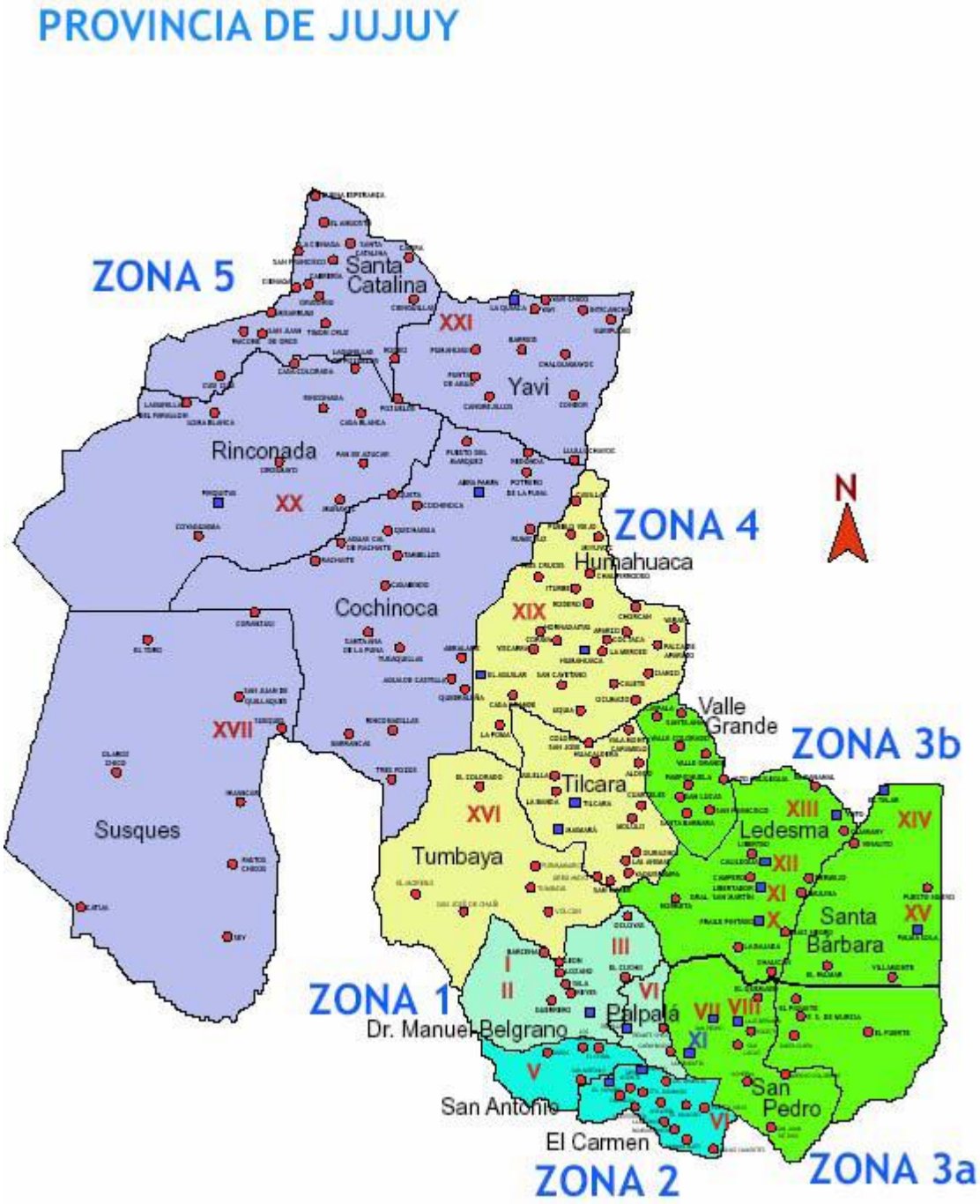


Figura Nº 4. Mapa de la provincia de Jujuy mostrando las cinco divisiones zonales que hace el sistema provincial de salud. Zonas Sanitarias: 1 Centro, 2 Valles, 4 Quebrada, 5 Puna y 3 Ramal
Fuente: Dirección de Bioquímica de la Provincia de Jujuy.

A cada una de estas zonas se las subdivide en áreas sanitarias, con un total de 22 áreas programáticas donde en ellas se encuentran 27 hospitales de cabeceras y 270 Centros de Atención Primaria de Salud (CAPS). Figura Nº5.

Dichas zonas sanitarias tienen coincidencias con la división geográfica del territorio provincial figura Nº3.

PROVINCIA DE JUJUY
Áreas Programáticas y División Política

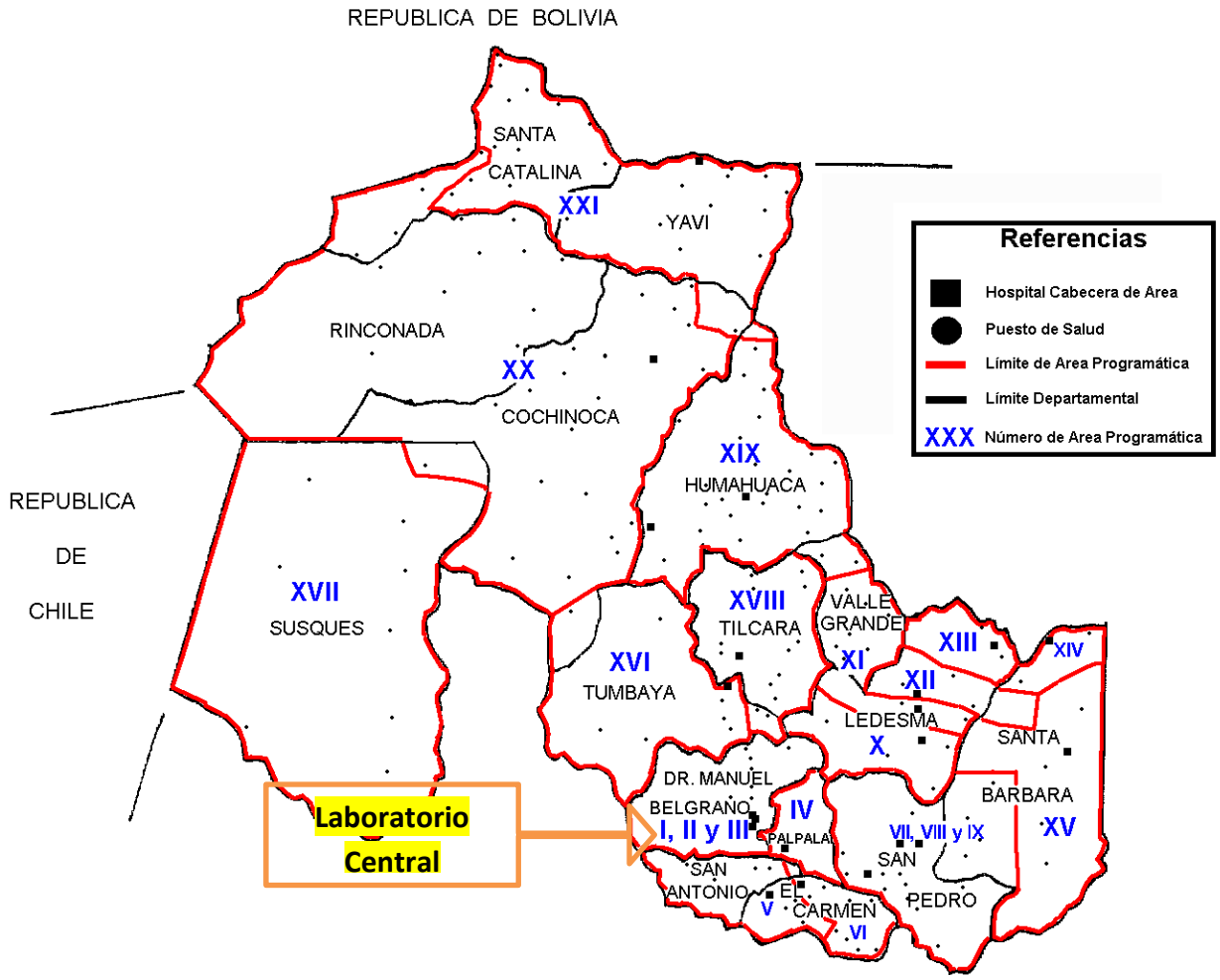


Figura Nº 5. Ref. Mapa de la provincia de Jujuy con división política y mostrando las veintidós áreas programáticas, hospitales de cabecera, y puesto de salud.
Fuente: Dirección de Bioquímica de la Provincia de Jujuy.

Hospitales Cabecera de Área:

I. San Roque
II. Centro Sanitario
III. Ing. G. Snopek
IV. Wenceslao Gallardo
V. Nuestra Señora del Carmen
VI. Plinio Zabala
VII. Guillermo Paterson
VIII. La Esperanza
IX. La Mendieta
X. Escolástico Zegada
XI. Oscar Orías
XII. Calilegua
XIII. San Miguel
XIV. Nuestra Señora del Pilar
XV. Nuestra Señora del Valle
XVI. Maimará
XVII. Unidad Sanitaria Susques
XVIII. Salvador Mazza
XIX. General Manuel Belgrano
XX. Nuestra Señora del Rosario
XXI. Jorge Uro

3.9.1 Síntesis de la organización de la red provincial de Dengue

La red provincial de dengue cuenta con un laboratorio de referencia provincial, el Laboratorio Central de Salud Pública, ubicado en la capital de la província. Realiza las siguientes técnicas diagnósticas para virus Dengue: UM-ELISA, Mac-ELISA, ELISA Ag NS1 e investigación directa ARN viral por método de rt-PCR (de punto final y en tiempo real). A su vez en la zona de las yungas se encuentran los laboratorios de los hospitales G. Paterson de San Pedro de Jujuy y Oscar Orías de Libertador General San Martín, con capacidad de realizar UM-ELISA y ELISA Ag NS1.

Todos los laboratorios de los hospitales de la zonas de los valles, quebrada y puna derivan al laboratorio central las muestras para que se investigue allí la infección por virus dengue. En cambio los hospitales de la zona de las yungas (P. S. Caimancito (Caimancito), H. Calilegua (Calilegua), H. N.Sra. del Pilar (El Talar), H. Escolástico Zegada (Fraile Pintado), H. La Esperanza (La Esperanza), H. N.Sra. del Valle (Palma Sola), H San José de Yuto (Yuto), H La Mendieta ((La Mendieta), derivan las muestras a sus laboratorios de cabecera, H. Oscar Orías de Libertador General San Martín y Paterson de San Pedro, para que se investiguen allí la infección por virus dengue usando las técnicas de UM-ELISA y ELISA Ag NS1. Una vez analizadas allí, si es necesario, estos laboratorios derivan las muestras al Laboratorio Central, para que se continúe la investigación. El Laboratorio Central además de continuar con los estudios pertinentes, es el encargado de la derivaciones de todos las muestras de la provincia al laboratorio de referencia nacional” Dr. Julio I. Maiztegui".

Los reactivos utilizados por la red provincial de dengue son provistos por la Dirección Nacional de Enfermedades Transmisibles por Vectores del Ministerio de Salud de la Nación para la provincia de Jujuy. El Laboratorio Central y los laboratorios provinciales mencionados que integran la red provincial de diagnóstico de dengue emplean los mismos reactivos. Los distintos lotes que se utilizan pasan por un control de calidad que se realiza en el Laboratorio Nacional de Referencia” Dr. Julio I. Maiztegui" antes de su distribución en el país.

3.10. Algoritmo de trabajo de la red de laboratorios y notificación de dengue a través del SIVILA.

La elección de las técnicas para el diagnóstico de laboratorio de dengue depende fundamentalmente del tiempo transcurrido entre el inicio de los síntomas y la toma de la muestra, pero el algoritmo de trabajo para la confirmación de los casos se adapta de acuerdo a la información epidemiológica de la región de procedencia del paciente.

El ÁREA SIN CIRCULACIÓN AUTÓCTONA de virus dengue o sin brote confirmado de dengue es aquella en la que no se han confirmado por laboratorio casos de dengue en pacientes sin antecedente de viaje reciente a zona afectada. Para el diagnóstico debemos tener en cuenta dos situaciones:

Si la muestra es obtenida ANTES de los 5 días de iniciados los síntomas, se procesa mediante: Detección de Antígeno NS1, si el resultado es POSITIVO, deberá consignarse como resultado de laboratorio: **Dengue PROBABLE** y ser procesada mediante Aislamiento viral y/o detección molecular de genoma viral. En el caso de que el resultado de este último estudio resultara POSITIVO: se confirma el caso de dengue y deberá consignarse como resultado de laboratorio: **CONFIRMADO Virus del Dengue y serotipo**. Si el resultado es NEGATIVO, no se descarta el diagnóstico y deberá consignarse como Resultado de Laboratorio **Dengue SOSPECHOSO - RESULTADO NO CONCLUSIVO**. Se debe solicitar nueva muestra de suero con más de 5 días de evolución. En el caso de que la detección de Antígeno NS1 de la muestra de obtenida ANTES de los 5 días de iniciados los síntomas resultara NEGATIVO, no se descarta el diagnóstico y deberá consignarse como resultado de laboratorio: **Dengue SOSPECHOSO – RESULTADO NO CONCLUSIVO**. Se debe solicitar nueva muestra de suero con más de 5 días de evolución.

Si la muestra de suero es obtenida DESPUÉS de 5 o más días de iniciados los síntomas, se procesa mediante: detección de anticuerpos IgM de virus dengue, si el resultado es NEGATIVO: se descarta el diagnóstico de dengue. Se deberá consignar como resultado de laboratorio **Negativo**. Si el resultado es POSITIVO: se deberá consignar como resultado de laboratorio: **Dengue PROBABLE** y tomar nueva muestra obtenida entre 10 a 15 días posteriores a la primera. En este caso se procesa el par serológico que comprende una muestra del período agudo y de la convalecencia de la enfermedad se procesa con detección de anticuerpos IgG por Neutralización. Si se determina la SEROCONVERSIÒN se deberá consignar como resultado de laboratorio: **CONFIRMADO Virus del Dengue y serotipo** cuando fuera posible. De lo contrario consignar **CONFIRMADO Virus del Dengue (Flavivirus, Flaviviridae) o Flavivirus, Flaviviridae (caso de infección por Flavivirus confirmado).** Si se determinan títulos CONSTANTES se deberá consignar como resultado de laboratorio **Dengue ANTERIOR**. Y si el resultado es NEGATIVO, se descarta el diagnóstico de dengue. Se deberá consignar como resultado de laboratorio **Negativo.**

Cuando nos encontramos EN ÁREAS CON CIRCULACIÓN AUTÓCTONA DE VIRUS DENGUE es decir aquella en la que se han confirmado por laboratorio mediante aislamiento viral y/o detección del genoma viral y/o seroconversión mediante prueba de neutralización para virus dengue, en muestras de suero pareadas del período agudo y de la convalecencia de

pacientes SIN antecedentes de viaje reciente a zona afectada. En esta situación cuando: se obtengan resultados Positivos para NS1, aislamiento viral, detección molecular del genoma viral, IgM, Neutralización, se deberá consignar como Resultado de Laboratorio: **DENGUE CONFIRMADO.** Cuando se obtenga resultado Negativo por IgM en muestras obtenidas después de 5 o más días de evolución, se deberá consignar como Resultado de Laboratorio: **NEGATIVO.** Y Cuando se obtenga resultado Negativo por aislamiento viral y/o detección molecular en muestras obtenidas antes del 5º día de evolución, se deberá consignar como resultado de laboratorio: **DENGUE SOSPECHOSOS-RESULTADO NO CONCLUSIVO. (35)**

En la figura Nº 6 se puede observar esquemáticamente el algoritmo de trabajo de laboratorios y notificación a través de SIVILA.

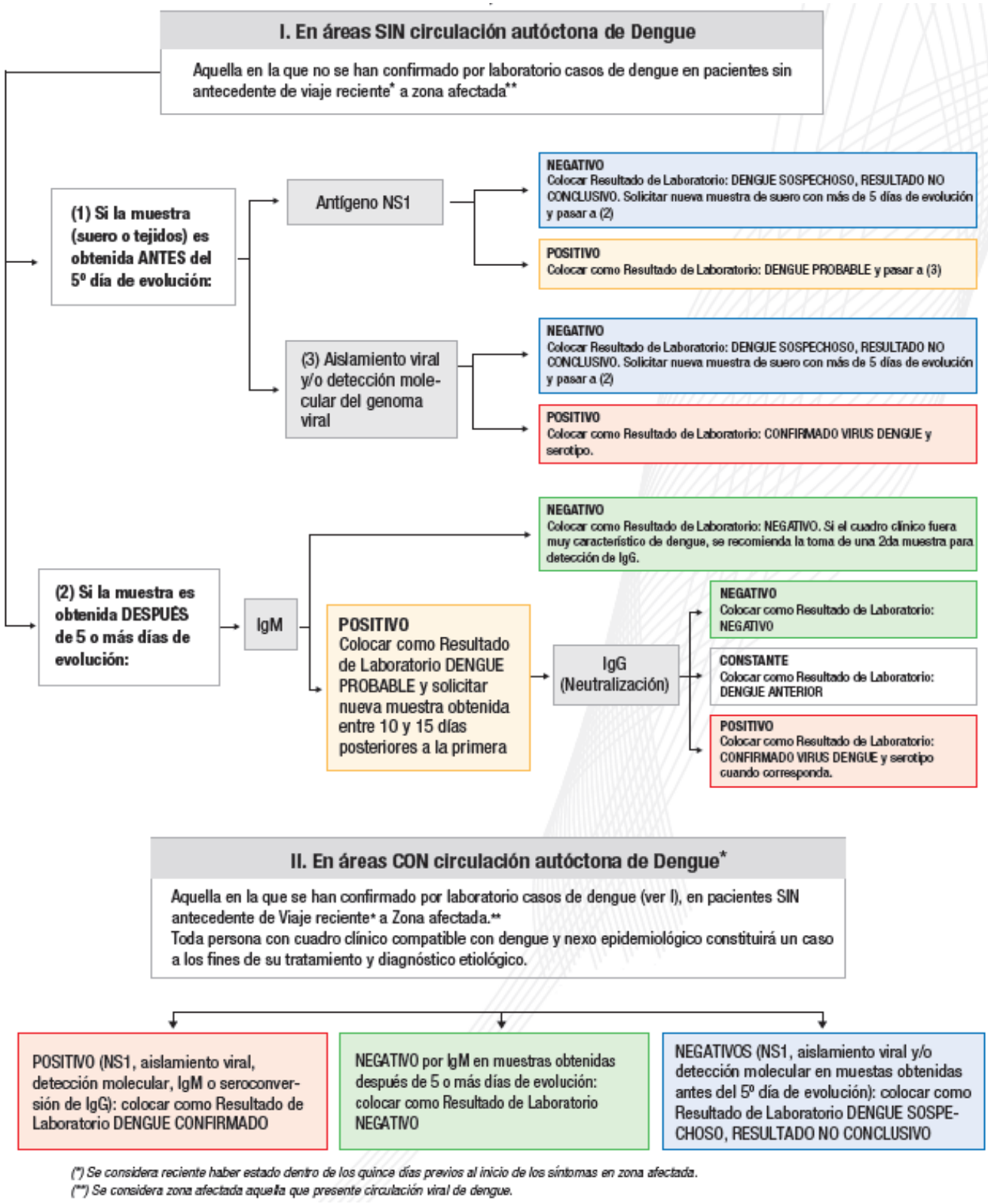


Figura Nº 6. Algoritmo de trabajo de laboratorios y notificación a través de SIVILA.
Fuente www.msal.gov.ar

4. Objetivo

El objetivo es investigar la circulación de OROV mediante técnicas moleculares en muestras de casos clínicos compatibles con dengue, pero virológicamente negativos para ese virus, de la provincia de Jujuy (Noviembre 2009-enero 2011).

Esta investigación permitirá discernir si uno de los causantes de los síndromes febriles encontrados en el período anteriormente mencionado es ocasionado por OROV, el cual no es tenido en cuenta en el algoritmo diagnóstico de síndromes febriles inespecíficos. .

5. Materiales y métodos

El presente estudio cuenta con la aprobación del Comité de Bioética de la provincia de Jujuy, anexo1

5.1. Período de estudio

Las muestras fueron recolectadas desde noviembre del año 2009 hasta enero del 2011, estudiándose un total de 160 muestras.

5.2. Origen de las muestras

Se estudiaron 160 muestras de suero remitidas por los diferentes laboratorios regionales de la provincia de Jujuy, y derivadas al Laboratorio de Biología Molecular-Laboratorio Central de Salud Pública de la provincia, donde se realizaron las determinaciones correspondientes.

Los laboratorios que derivaron muestras distribuidos por zonas geográficas, se listan en la tabla Nº3.

Tabla Nº 3. Diferentes laboratorios de la provincia de Jujuy que derivaron muestras distribuidos por zonas geográficas.

Región geográfica	Hospitales
Valles	Hospital de niños Dr. H. Quintana (San salvador de Jujuy), H. Pablo Soria (San salvador de Jujuy), H. San Roque (San salvador de Jujuy), H. Monterrico (Monterrico) H nuestra Sra. Del Carmen (El Carmen).
Yungas	H. Caimancito (Caimancito), H. Calilegua (Calilegua), H. N.Sra. del Pilar (El Talar), H. Escolástico Zegada (Fraile Pintado), H. La Esperanza (La Esperanza), H. Oscar Orías (Libertador General San Martín), H. N.Sra. del Valle (Palma Sola), H. Dr. Guillermo Paterson (San Pedro), H. San Miguel (Yuto).
Puna	H. Dr. Jorge Uro (La Quiaca).
Quebrada	Ningún hospital de esta región derivó muestras de pacientes con síntomas febriles inespecíficos.

5.3. Tipo de muestras

La muestra usada para el estudio fue suero fresco, extraído por punción venosa.

El suero fue remitido al Laboratorio Central de Salud Pública correctamente rotulado, de forma refrigerada y en triple envase, reuniendo todas las condiciones de bioseguridad establecidas por el laboratorio de referencia provincial (Laboratorio Central de Salud Pública de la provincia).

En ciertos casos la muestra debía ser utilizada por los laboratorios derivantes, por lo que luego de ser utilizada se refrigeraba hasta remitirla al laboratorio de referencia provincial donde era guardada a -70ºC hasta su posterior utilización, por un lapso no mayor a un año.

5.4. Criterios de selección de las muestras

Se seleccionó toda aquella muestra, provenientes de pacientes con síndromes febriles inespecíficos (caso), clasificados como “dengue sospechosos” por su evolución clínica, según criterio del profesional médico que lo evaluó.

Se definió como caso a toda persona de cualquier edad y sexo que presenta fiebre, de menos de siete días de duración, mialgias y cefaleas sin afección de las vías aéreas superiores y sin etiología definida.

Al pedido de análisis se acompañaba de la ficha epidemiológica, de “Vigilancia de Síndrome Febril” (anexo 2), facilitada por la dirección de Epidemiología de la Provincia y el Laboratorio Central de Salud Pública, donde era obligatorio completar correctamente los siguientes datos:

- Datos completos del paciente.
- Días de evolución de la enfermedad y fecha de toma de muestra.
- Si viajó a alguna zona con incidencia de dengue o arbovirus relacionados en los últimos 15 días.
- Y si fue vacunado contra la fiebre amarilla.

Todas las muestras que fueron remitidas sin ficha epidemiológica debidamente completada, al menos con los ítems listados anteriormente y firmados por el profesional de salud responsable del pedido, no se procesaron, debido a que no se podía discriminar en qué período de la infección se encuentra el paciente para evitar realizar un diagnóstico erróneo.

Se estudiaron todos aquellos sueros cuyo período de evolución estén comprendidos entre 0 y 4 días de evolución desde el comienzo de inicio de síntomas.

5.5. Procesamiento de las muestras

El procesamiento de la muestra varío dependiendo de quienes fueran los laboratorios derivantes, aquellos laboratorios con capacidad de realizar estudios de antígeno NS1 para dengue, es el caso de los laboratorios del **Hospital G. Paterson de San Pedro de Jujuy y Hospital Oscar Orías de Libertador General San Martín**, remitieron en forma refrigerada al laboratorio Central todas aquellas muestras que dieran negativas para el estudio antígeno NS1.

Una vez que la muestra se encontraba en el laboratorio Central, 150 ul de la misma era utilizada para la extracción del material genético (ARN) con el equipo NucleoSpin® RNA Virus de (Macherey Nagel) (según indicaciones del fabricante). El resto de la muestra junto con el ARN extraído se guardó a -70ºC.

El resto de los laboratorios que no cuentan con la capacidad de diagnóstico de dengue a través de la detección de antígeno NS1, remitieron el suero de manera refrigerada para que se realicen los análisis correspondientes en el Laboratorio Central.

De la muestra enviada se utilizó 50 ul para el estudio de Ag NS1 y 150 ul se utilizó para la extracción del material genético (ARN) con el equipo NucleoSpin® RNA Virus de (Macherey Nagel) (según indicaciones del fabricante). El resto de la muestra junto con el ARN extraído se guardó a -70ºC.

5.6. Estudios de screening para dengue

5.6.1. Investigación de Antígeno NS1 por método de ELISA "Sandwich"

A todas las muestras se les estudió la presencia del Ag NS1 con el reactivo comercial de la marca (Bio-Rad) "Platelia Dengue NS1 Ag" según indicaciones del fabricante (35) figura Nº 6. La detección del antígeno NS1 en el estudio de las infecciones por dengue se utiliza como técnica de screening de muestras agudas. Esta glicoproteína puede detectarse hasta el día 13, pero la sensibilidad de su detección disminuye a medida que aumentan los días de evolución. Es una metodología que no determina serotipo. Es un método sumamente útil para valorar infección aguda de virus dengue, en aquellos laboratorios que no cuentan con la infraestructura para realizar estudios moleculares.

Figura Nº 6 Indicación esquemática del funcionamiento y procedimiento del reactivo comercial "Platelia Dengue NS1 Ag.

5.6.2. Evaluación de calidad de la muestra para estudios moleculares.

Para evaluar si las muestras estaban en condiciones de ser analizadas se estudió la presencia de la RNasa P humana. Este sistema analiza la presencia de ARN de genes humanos de la RNAsa P, para indicar si la muestra a analizar es de calidad aceptable.

Del total de las 160 muestras, se seleccionó a las 60 muestras más antiguas o aquellas que puedan prestar alguna duda en su transporte. Se escogió las muestras más antiguas para certificar que la conservación de las mismas en el laboratorio era correcta y en algunos casos se evaluó la calidad de las muestras, que habían sido transportadas sin la refrigeración adecuada.

Para ello se eligió como técnica una rt-PCR en Tiempo Real. Utilizando el protocolo descripto por el *Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) para el diagnóstico del nuevo subtipo del virus de influenza A (H1N1)1 28 de abril de 2009 (36).*

Los primers y sondas utilizados se listan en la tabla 4:

Tabla Nº 4. Primers y sondas utilizados en el proceso de evaluación de calidad de la muestras.

Nombres	Secuencias 5`-3`	Fuoroforo/quencher
RnaseP Forward	AGA TTT GGA CCT GCG AGC G	
RnaseP Reverse	GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT	
RnaseP Sonda	TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG	FAM/BHQ-1

Ref. *Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC). (36).*

El protocolo de trabajo utilizado, fue el recomendado por la enzima, SuperScript III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System de la empresa (Invitrogen) tabla Nº5.

Tabla Nº 5. Protocolo de amplificación para el estudio de presencia de la RNasa P humana por rt-PCR en tiempo real.

Reactivos	Volúmenes de reactivo por reacción	Concentración final uM
Agua libre de nucleasas	5.5 µl	0,2
RnaseP Forward (10uM)	0.5 µl	0,2
RnaseP Reverse (10uM)	0.5 µl	0,2
RnaseP Probe (10uM)	0.5 µl	0,2
SuperScript™ III RT/Platinum® *Taq* Mix	0.5 µl	
PCR Master Mix 2X	12.5 µl	
Muestras	5 ul	
Volumen total	20.0 µl	

Ref. *Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC). (36).*

Las condiciones de amplificación para una reacción de 25 ul son las citadas a continuación tabla Nº 6:

Tabla Nº 6. Condiciones de amplificación para el estudio de presencia de la RNasa P humana por rt-PCR en tiempo real.

Transcripción inversa	50ºC por 30 min
Activación de inhibidor Taq	95 ºC por 2 min
Amplificación de PCR Amplificación de PCR	95 ºC por 15 seg 55 ºC por 30 seg*
*Deben recolectarse los datos de fluorescencia (FAM) durante el paso de incubación de 55 ºC	

Ref. ***Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC). (36).***

Para la interpretación del resultado se siguió las recomendaciones del protocolo de diagnóstico citado en el CDC (36).

Para considerar como aceptable una muestras, todos los sueros deben exhibir curvas de reacción RP que crucen la línea umbral en los primeros 37 ciclos, indicando así la presencia de ARN de genes humanos RNase P.

5.6.3. Investigación de material genético viral (ARN) por método de rt-PCR

Todas las muestras derivadas al Laboratorio de Virología del Laboratorio Central provincial, se les estudió la presencia de ARN viral por la técnica de rt-PCR en el Laboratorio de Biología Molecular.

Las muestras analizadas durante el año 2009 hasta enero del 2010 (inclusive) se las investigó utilizando la técnica de rt-PCR multiplex modalidad anidada (nested) de punto final, según el protocolo descripto por Lanciotti y col. *(37)* recomendado por la Red Nacional de Dengue. Se estudiaron un total de 48 muestras por esta técnica. Esta técnica se llevó a cabo en un termociclador marca Labnet modelo MultiGene.. Utilizando los controles provistos por el instituto Maiztegui (INEVH).

Esta metodología permite amplificar la región codificante C-prM del virus dengue. Consta de un paso inicial de retrotranscripción seguido de una primera amplificación, que se realiza en conjunto (un solo paso), utilizando los primers D1 y D2, generando un fragmento de 511 pb que no permite discernir el tipo viral. Con una dilución 1/50 de la primera amplificación se lleva a cabo una segunda amplificación, con los primers D1, TS1, TS2, TS3, TS4, cuyos productos de amplificación se corren en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Este sistema permite tipificar los 4 tipos virales de dengue.

A continuación se lista las secuencias de los primers con los tamaños de los amplicones (tabla 7).

Tabla Nº 7. Primers utilizados para la amplificación de virus dengue por rt-PCR multiplex modalidad anidada (nested) de punto final.

Región del genoma amplificada	Primer	Secuencia 5'-3'	Tamaño del ADN amplificado (pb)
C-prM	D1	TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG	511
	D2	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC	511
	TS1	CGTCTCAGTGATCCGGGGG	482 (D1-TS1)
	TS2	CGCCACAAGGGCCATGAACAG	119 (Dl -TS2)
	TS3	TAACATCATCATGAGACAGAGC	290 (Dl -TS3)
	TS4	CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA	392 (Dl -TS4)

Ref. Lanciotti y col *(37).*

Los protocolos de amplificación utilizados y las condiciones de ciclado se detallan a continuación en la tabla Nº 8:

Tabla Nº 8. Protocolo de amplificación del primer round para el estudio de presencia de virus dengue por rt-PCR multiplex modalidad anidada (nested) de punto final.

RT-PCR + Round1			
	Concentración Stock	x1 (ul)	Concentración final
H2O		20,8	
Buffer 10X	5x	3,3	1x
CL2Mg	25mM	1,8	1,5mM
dNTP Mix	10 mM	0,6	0.1uM
DTT	0,1 M	1,5	0,005M
RNAsin		0,1	
D1	100 uM	0,3	1.2uM
D2	100 uM	0,3	1.2uM
TAQ	5 U/µl	0,3	1,5 U
AMV	20 U/µl	0,1	2 U
Volumen de MIX.		29,1	
Volumen de reacción		27(mix)+3 (muestra)	
Total		30	

Ref. Lanciotti y col *(37)*

Las condiciones de amplificación son las citadas en la tabla Nº9.

Tabla Nº 9. Condiciones amplificación del primer round para el estudio de presencia de virus dengue por rt-PCR multiplex modalidad anidada (nested) de punto final.)

Temperatura	Tiempo	
55ºC	65 minutos	
95°C	15 minutos	
94°C	2 minutos	
94°C	30 segundos	35 ciclos
55ºC	1 minutos	
72°C	2 minutos	
72°C	10 minutos	

Ref. Lanciotti y col *(37)*

Protocolo de amplificación del segundo round en tabla Nº 10.

Tabla Nº 10. Protocolo de amplificación del segundo round para el estudio de presencia de virus dengue por rt-PCR multiplex modalidad anidada (nested) de punto final.

Round 2			
	Concentración Stock	x1 (ul)	Concentración final
Buffer	10x	3,3	1x
CL2Mg	25mM	1,8	1,5 mM
dNTPs	10 mM	0,6	0.2 mM
D1	100 uM	0,3	1uM
TS1	100 uM	0,3	1uM
TS2	100 uM	0,3	1uM
TS3	100 uM	0,3	1uM
TS4	100 uM	0,3	1uM
TAQ	5 U/µl	0,3	1,5 U
H2O	10x	21,6	
Volumen de MIX.		29,1	
Volumen de reacción		27(mix)+3 (muestra)	
Total		30	
Diluir producto del primer round en 1/50 (2 ul R1 + 98 ul) H2O			

Ref. Lanciotti y col *(37)*

Las condiciones de amplificación son las citadas en la tabla Nº 11.

Tabla Nº 11. Condiciones amplificación del segundo round para el estudio de presencia de virus dengue por rt-PCR multiplex modalidad anidada (nested) de punto final.)

Temperatura	Tiempo	
94°C	2 minutos	
94°C	30 segundos	35 ciclos
55ºC	1 minutos	
72°C	2 minutos	
72°C	10 minutos	

Ref. Lanciotti y col *(37)*

La transcriptasa reversa utilizada fue la *AMV Reverse Transcriptase® marca* (Fermentas), y las polimerasas, *Taq DNA Polymerase (recombinant) (5 U/µL)* ® de (Fermentas). Como inhibido de RNAasa, se utilizó varias marcas como el RNasin® de (Promega) o Ribolock® de (Fermentas). Se utilizó enzimas de diferentes marcas, por la dificultad en conseguir el producto RNasin® de (Promega), entre las empresas proveedoras de reactivos, por lo cual se optó por un producto similar y compatible pero de otra marca.

El resto de las 112 muestras fueron estudiadas utilizando la técnica rt-PCR multiplex Tiempo Real según protocolo descripto por Johnson y col *(38)*.

Se trata de una retrotranscripción seguida de una amplificación (en un solo paso) utilizado sondas TaqMan. El sistema cuenta con un par de primer para cada tipo viral y su sonda correspondiente. Cada sonda está marcada con diferentes fluoróforos, de manera que pueda ser utilizado como una PCR multiplex en tiempo real, que permite estudiar los cuatro tipos virales en un solo tubo de reacción. Esta técnica se llevó a cabo en un termociclador de tiempo real marca BioRad modelo CFX 96.

Para todas las determinaciones se utilizó la enzima *SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System* de (Invitrogen), según indicaciones del fabricante.

En los casos que fue necesario reestudiar las muestras por dudas en el resultado, se utilizó la misma técnica pero en formato monoplex (estudiando cada tipo viral por separado).

En todos los casos se consideró positiva a toda muestras clínica que exhibía curvas de reacción en alguno de los serotipos que crucen la línea umbral (Ct) en los primeros 36 ciclos. Toda curva de reacción con Ct mayor a 37 no era considerada. Según las recomendaciones del protocolo original descripto por Johnson y col.

Los primers utilizados con sus respectivos fluoróforos de citan en la tabla Nº 12.

Tabla Nº 12. Primers y sondas utilizados en el diagnóstico de dengue por rt-PCR en tiempo real.

Tipo viral	Primer-Sonda	Secuencia 5'-3'	Fluoróforo/quencher
Dengue 1	DEN-1 F DEN-1 C	CAAAAGGAAGTCGTGCAATA CTGAGTGAATTCTCTCTACTGAA CC	
	DEN-1 Sonda	CATGTGGTTGGGAGCACGC	FAM/BHQ-1
Dengue 2	DEN-2 F DEN-2 C	CAGGTTATGGCACTGTCACGAT CCATCTGCAGCAACACCATCTC	
	DEN-2 Sonda	CTCTCCGAGAACAGGCCTCGACT TCAA	HEX/BHQ-1
Dengue 3	DEN-3 F DEN-3 C	GGACTGGACACACGCACTCA CATGTCTCTACCTTCTCGACTTGT CT	
	DEN-3 Sonda	ACCTGGATGTCGGCTGAAGGAG CTTG	TR/BHQ-2
Dengue 4	DEN-4 F DEN-4 C	TTGTCCTAATGATGCTGGTCG TCCACCTGAGACTCCTTCCA	
	DEN-4 Sonda	TTCCTACTCCTACGCATCGCATT CCG	Cy5/BHQ-2

Ref. Johnson y col (38).

Los protocolos de amplificación utilizados y RT-PCR multiplex se detallan a continuación tabla Nº 13.

Tabla Nº 13. Protocolo de amplificación para el estudio de virus dengue por rt-PCR en tiempo real, modalidad multiplex

RT-PCR tiempo real Dengue			
	Concentración Stock	x1 (ul)	Concentración final
Buffer mix	2x	12,5	
D1 F	10 uM	0,5	0,2 uM
D1 R	10 uM	0,5	0,2 uM
Probe D1	10 uM	0,5	0,2 uM
D2 F	10 uM	0,5	0,2 uM
D2 R	10 uM	0,5	0,2 uM
Probe D2	10 uM	0,5	0,2 uM
D3 F	10 uM	0,5	0,2 uM
D3 R	10 uM	0,5	0,2 uM
Probe D3	10 uM	0,5	0,2 uM
D4 F	10 uM	0,5	0,2 uM
D4 R	10 uM	0,5	0,2 uM
Probe D4	10 uM	0,5	0,2 uM
Enzima	4U/uL	0,5	2U
H2O		1	
Volumen de MIX		20	
Producto		5	
Total		25	

Ref.Johnson y col (38).

Los protocolos de amplificación utilizados como RT-PCR monoplex se detallan a continuación tabla Nº 14.

Tabla Nº 14. Protocolo de amplificación para el estudio de virus dengue por rt-PCR en tiempo real, modalidad monoplex.

RT-PCR tiempo real Dengue			
	Concentración Stock	x1 (ul)	Concentración final
Buffer mix	2x	12,5	
D F	10 mM	0,5	0,2 uM
D R	10 mM	0,5	0,2 uM
Probe D	10 uM	0,5	0,2 uM
Enzima	4U/uL	0,5	
H2O		5,5	
Volumen de MIX		20	
Producto		5	
Total		25	

Ref. Johnson y col (38).

Las condiciones de amplificación se citan en la tabla Nº15.

Tabla Nº 15. Condiciones amplificación para el estudio de virus dengue por rt-PCR en tiempo real, modalidad monoplex y multiplex.

Transcripción inversa	50ºC por 30 min
Activación de inhibidor Taq	95 ºC por 2 min
Amplificación de PCR Amplificación de PCR	95 ºC por 15 seg 55 ºC por 30 seg*
***Deben recolectarse los datos de fluorescencia FAM , HEX, Cy5, Texas red durante el paso de incubación de 55 ºC**	

Ref. Johnson y col (38).

Para ambas técnicas se utilizaron los controles provistos por la Red Nacional de Dengue.

5.7. Estudio de diagnóstico para OROV

5.7.1 Investigación de material genético viral (ARN) por método de rt-PCR

La investigación de OROV se realizó mediante la técnica de rt-PCR modalidad anidada según protocolo cedido por la Red Nacional de Dengue. Extraído del protocolo de Mohammad y col. (39). Se trata de una primera amplificación con primers ORO 1 y ORO 2 que flanquean una región conservada del segmento S del ARN viral perteneciente al género Bunyavirus. La segunda amplificación se realizó con los primers ORON5 y ORON3 que complementa con la secuencia de la proteína N del segmento genómico S de virus ORO, dando un fragmento de 693 pb. El resultado se evidencia en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Esta técnica se llevó a cabo en un termociclador marca Labnet modelo MultiGene. Utilizando los controles provistos por el instituto Maiztegui (INEVH) cepa BeAn 19991- Brasil.

Secuencia de primers utilizados en tabla Nº 16.

Tabla Nº 16. Primers utilizados en el diagnóstico de OROV por la técnica de rt-PCR modalidad anidada.

Región del genoma amplificada	Primer	Secuencia 5'-3'	Tamaño del ADN amplificado (pb)
Segmento S de ARN	ORO1A	AGTAGTGTACTCCACTAT	**754**
	ORO2S	AGTAGTGTGGCTCCACAT	
Gen de proteína N (del ARN S)	ORON5	AAAGAGGATCCAATAATGTCAGAGTTCATTT	**693**
	ORON3	GTGAATTCCACTATATGCCAATTCCGAATT	

Ref. Mohammad y col. (39).

El protocolo de amplificación se cita en la tabla Nº 17.

Tabla Nº 17. Ref. Protocolo de amplificación del primer round para el estudio de presencia de OROV por rt-PCR modalidad anidada (nested) de punto final.

RT-PCR + Round1 Oropouche			
	Concentración Stock	x1 (ul)	Concentración final
H2O		38	
Buffer 10X	10x	5	1x
CL2Mg	25mM	1,5	1,5mM
dNTP Mix	10 mM	1	0.5uM
DTT	0,1 M	2,5	0,005M
RNAsin		0,5	
ORO1A	100 uM	0,5	1.2uM
ORO1S	100 uM	0,5	1.2uM
TAQ	5 U/µl	0,5	1,5 U
AMV	20 U/µl	0,1	2 U
Volumen de MIX.		50,1	
Volumen de reacción		45 (mix)+5 (producto)	
Total		50	

Ref. Mohammad y col. (39).

Condiciones de amplificación en tabla Nº 18.

Tabla Nº 18. Condiciones amplificación del primer round para el estudio de presencia de OROV por rt-PCR modalidad anidada (nested) de punto final.

Temperatura	Tiempo	
42ºC	60 minutos	
94°C	3 minutos	
94°C	40 segundos	35 ciclos
52ºC	40 segundos	
72°C	4 minutos	
72°C	10 minutos	

Ref. Mohammad y col. (39).

Al igual que en el estudio de dengue la transcriptasa reversa utilizada fue *AMV Reverse Transcriptase*® marca (Fermentas), y las polimerasas *Taq DNA Polymerase (recombinant) (5 U/µL)* ® de (Fermentas). Como ihibidor de RNAasa, se utilizó varias marcas como el RNasin® de Promega o Ribolock® de (Fermentas).v Se utilizó enzimas de diferentes marcas, por la dificultad en conseguir el producto RNasin® de (Promega), entre las empresas proveedoras de reactivos, por lo cual se optó por un producto similar y compatible pero de otra marca. El protocolo de amplificación usado para el segundo round se muestra en la tabla Nº 19.

Tabla Nº 19. Ref. Protocolo de amplificación del segundo round para el estudio de presencia de OROV por rt-PCR modalidad anidada (nested) de punto final.

PCR + Round2 Oropouche			
	Concentración Stock	x1 (ul)	Concentración final
H2O		34,5	
Buffer 10X	10x	5	1x
CL2Mg	25mM	3	1,5mM
dNTP Mix	10 mM	1	0,2uM
ORON5	100 uM	0,5	1,0uM
ORON3	100 uM	0,5	1,0uM
TAQ	5 U/µl	0,5	1,5 U
Volumen de MIX.		50	
Volumen de reacción		45+5	
Total		50	
Diluir producto del primer round en 1/50 (2 ul R1 + 98 ul) H2O			

Ref. Mohammad y col. (39).

Las condiciones de amplificación en la tabla Nº 20.

Tabla Nº 20. Condiciones amplificación para el segundo round del estudio de OROV por rt-PCR modalidad anidada (nested) de punto final.

Temperatura	Tiempo	
94°C	3 minutos	
94°C	40 segundos	35 ciclos
60ºC	40 segundos	
72°C	4 minutos	
72°C	10 minutos	

Ref. Mohammad y col. (39).

Resultados

6.1. Muestras estudiadas

Se recolectaron muestras desde noviembre del año 2009 hasta enero del 2011. En base a los criterios de selección de muestras, fueron aceptadas y analizadas 160 muestras, provenientes de diferentes zonas de la provincia tabla Nº 21 y figura Nº: 7 y 8.

Tabla Nº 21. Procedencia de las muestras y la distribución de cada una discriminada por zonas geográficas.

Zonas de la provincia de Jujuy	Ciudades o municipios de las Zonas	Cantidad de muestras
Valles	Capital	32
	El Carmen	18
	Monterrico	5
	Palpala	8
	Perico	2
	Reyes	1
Yungas	Caimancito	14
	Calilegua	1
	El Talar	12
	Fraile Pintado	7
	La Esperanza	1
	Libertador Gral. San Martín	17
	Palma Sola	1
	San Pedro	37
	Yuto	3
Puna	La Quiaca	1
Quebrada	----------	0
Total	160	

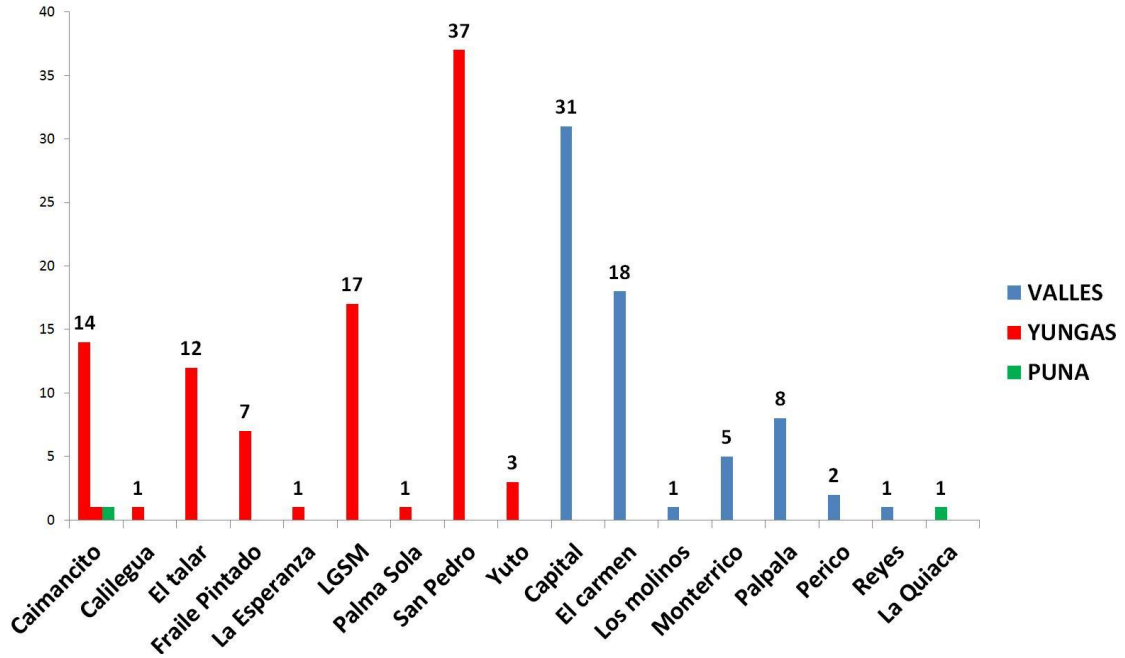


Figura Nº 7. Procedencia de las muestras discriminada por zonas geográficas y sus respectivas ciudades.

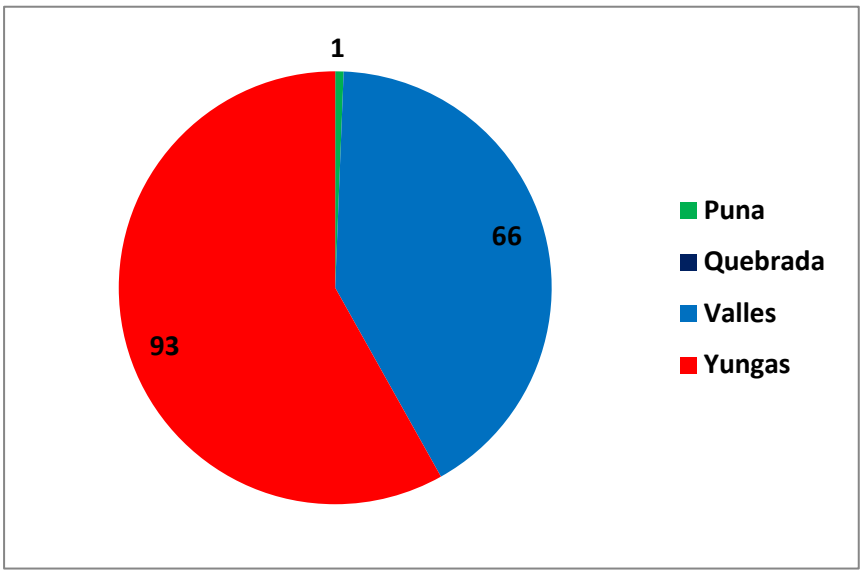


Figura Nº 8. Procedencia de las muestras discriminada por zonas geográficas.

Del total de muestras (160) el 58,75% (94) era de sexo masculino y el 41,25 (66) eran de sexo femenino.

La distribución de muestras, en relación a los días de evolución de la enfermedad en la que fue tomada, se muestra en la tabla Nº 22:

Tabla Nº 22. Número de muestras, en relación a los días de evolución de la enfermedad en la que fue tomada.

Días de Evolución	Número de muestras
4	46
3	48
2	29
1	36
0	1
Total	**160**

6.2. Investigación de antígeno NS1

Las 160 muestras analizadas presentaron Ag NS1 **NO DETECTABLE**. Este método funcionó como screening inicial para descartar una infección aguda por virus dengue. En base a las normativas del Programa Nacional de Dengue que recomienda confirmar este análisis utilizando un método de amplificación de ácidos nucleicos, se continuó el estudio de las muestras por PCR.

6.3. Análisis de la calidad de las muestras

Para evaluar si las muestras estaban en condiciones de ser analizadas se estudió la presencia de la RNasa P humana por la técnica de rt-PCR en Tiempo Real según protocolo del *Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) para el diagnóstico del nuevo subtipo del virus de influenza A(H1N1)1 28 de abril de 2009 (36).*

Las 60 muestras elegidas para evaluar su calidad presentaron un resultado satisfactorio. Todas cruzaron la línea umbral antes de los 37 ciclos al amplificar el fragmento del gen de la RNasa P humana.

Las 60 muestras analizadas fueron aquellas que podrían presentar dudas en su calidad porque tuvieron algún problema en alguna etapa de su transporte, almacenamiento o proceso. Como todas ellas pasaron por el control sin problemas, inferimos que las restantes 100, también estarían en buenas condiciones, ya que no presentan dudas en ninguna etapa del estudio. Por una cuestión de costos no se llegó a investigar la totalidad de las muestras y es de

aclarar que en el diagnóstico rutinario no se realiza este tipo estudio para evaluar el control de calidad a las muestras.

En la figura Nº9 se muestra el resultado del análisis de 6 muestras, más un control y blanco.

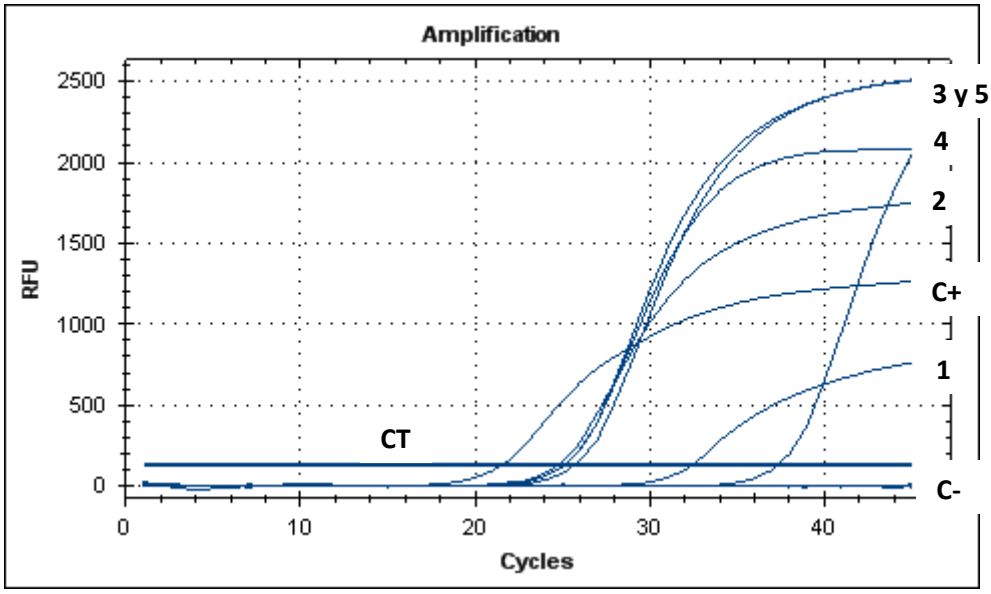


Figura Nº 9. Análisis de la calidad de las muestras estudiando una secuencia del gen de la RNasa P humana por rt-PCR en tiempo real. Muestras 1, 2, 3, 4 ,5 y 6. Control positivo: C+, Control sin templado más agua (H_2O): C-. Fluoróforo: FAN. RFU: Unidad de Fluorescencia

6.4. Investigación virus dengue por rt-PCR multiplex modalidad anidada (nested) y RT-PCR

En todos los casos, cuando se estudiaron las muestras por rt-PCR multiplex nested y por PCR en tiempo real, no se detectó material genético viral circulante. Lo que indicaría que dichas muestras están habilitadas para investigar la presencia de material genético de OROV.

En la figura Nº 10 se observa el resultado de una muestra de dengue 1 positivo, seguido de una muestra negativa, con los respectivos controles positivos y el marcador de peso molecular de 100 pb.

Figura Nº 10. Investigación virus Dengue, por rt-PCR multiplex modalidad anidada (nested). Calle 1: Muestra positiva de dengue 1, calle 2: Muestra no detectable para virus dengue, calle 3: Marcador de peso molecular de 100 pares de bases (100bp), calle 4: control positivo Dengue 1(D1), calle 5: control positivo dengue 2 (D2), calle 6: control positivo dengue 3 (D3), calle 4: control positivo dengue 4 (D4), calle 8: control negativo (H_2O).

En la figura Nº 11 se muestra las curvas logarítmicas de una corrida de diferentes controles de virus dengue por rt-PCR en tiempo real multiplex. Con sus respectivos blancos de reactivos.

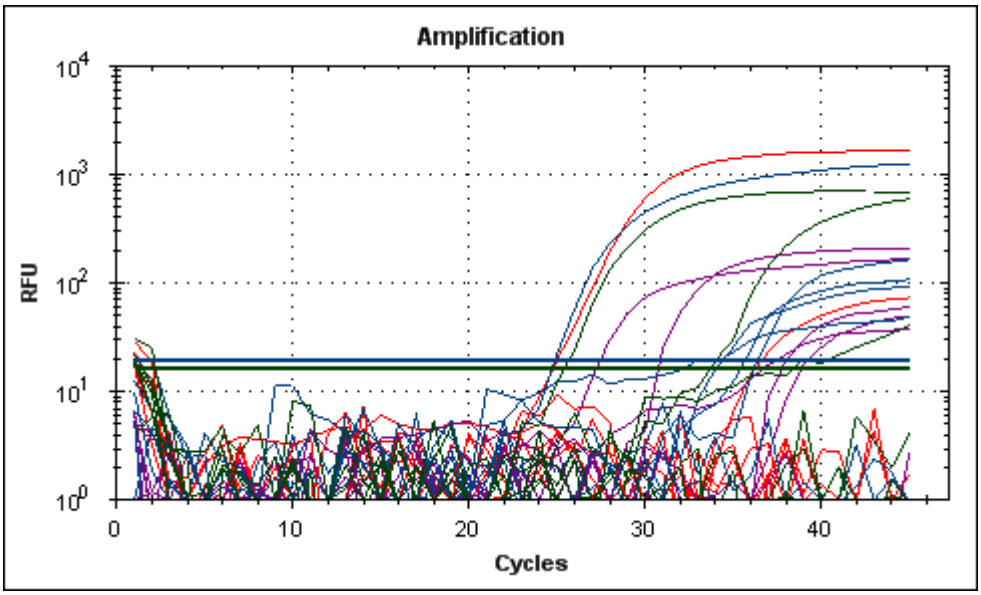


Figura Nº 11. Curvas logarítmicas de una corrida de virus dengue por rt-PCR en tiempo real multiplex. Curva rojas Controles positivos dengue 1, curva azul: controles positivos dengue 2, curva verde: controles positivos dengue 3 y curvas violetas: controles positivos dengue 4. Fluoróforos: FAN para dengue 1, HEX para dengue 2, Texas red para dengue 3 y Cy5 para dengue 4. RFU: Unidad de Fluorescencia Relativa. CT: threshold cycle.

Cabe mencionar que el algoritmo de trabajo recomendado por la red nacional de dengue indica que todo paciente con síndrome febril inespecífico,

que tenga una muestra tomada durante los primeros 5 días de evolución de la enfermedad y presente resultados no reactivo para Ag NS1 y no detectable para el estudio de material genético viral; debe ser tomado como *resultado no conclusivo.* La forma de aseverar que el origen del síndrome febril no se debe a una infección por virus dengue, es tomando una segunda muestra con 5 o más días de evolución, y certificar la ausencia de anticuerpos tipo Ig M.

Sin desconocer las indicaciones de la red nacional de dengue, consideramos que a pesar de no contar con la segunda muestra para certificar la no infección de virus dengue, el comprobar por dos técnicas diferentes que dichas muestras no presentan ni antígenos virales ni material genético de virus dengue circulante, ya las habilita como muestras aptas para la investigación de otro virus circulante causante de síndromes febriles inespecíficos.

6.5. Resultados investigación virus Oropouche

Las 160 muestras estudiadas para OROV por el método de rt-PCR nested fueron NO DETECTABLES. En ningún espécimen se pudo encontrar material genético de virus ORO circulante.

En la figura Nº 12 se observan los resultados negativos obtenidos luego de la separación electroforética de los amplicones en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

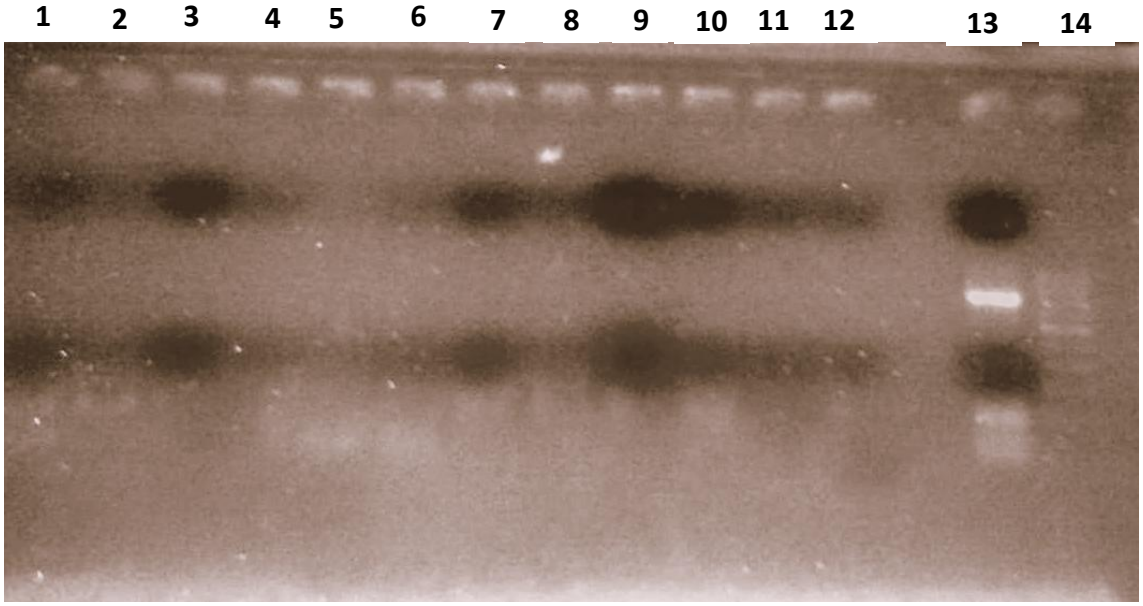


Figura Nº 12. Corrida electroforética de la investigación OROV, por rt-PCR multiplex modalidad anidada (nested). Calle 1 al 12: Muestras, calle 13: Control positivo, calle 14: Marcador de peso molecular de 100 pares de bases (100bp). Gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio.

7. Conclusiones

En el presente estudio se han analizado 160 muestras de pacientes con menos de 5 días de evolución, que presentaban síndromes febriles inespecíficos o clínica compatible con infección por virus dengue. Las muestras provenían de diferentes regiones de la provincia de Jujuy, derivados al laboratorio de referencia provincial, por los diferentes laboratorios pertenecientes al sistema de salud público. Este trabajo constituye uno de los primeros estudios sistemáticos en la provincia para la vigilancia del OROV basado en la detección de genoma viral en muestras agudas correspondientes a pacientes con síndromes febriles que quedan sin etiología.

Evidencias previas indicaban al OROV como uno de los posibles agentes etiológicos causantes de síndromes febriles que en la provincia quedan sin etiología. Especies de artrópodos que pueden comportarse como potenciales vectores urbanos y silvestres han sido reconocidas en Jujuy. En la región de las yungas existen los factores ecológicos, climas húmedos y altas temperaturas, que favorecen el desarrollo de los vectores del OROV, tanto el *Culicoides paraensis*, principal vector de la transmisión urbana, como así también otros vectores de menor relevancia, pero que también están implicados en la transmisión de la infección, *Coquillettidia venezuelensis, Ochlerotatus serratus* y *Culex quinquefasciatus,* han sido reportados.

Entre el período 2002-2003 en el que se estudiaron 132 muestras de diferentes puntos de Argentina (Buenos Aires, Córdoba, Corrientes, Formosa, Jujuy, Salta, Tucumán y Santa Fé), de las cuales 49 procedían de Jujuy. Todas ellas eran provenientes de pacientes con síndromes febriles inespecíficos o clínica compatible con dengue. Se investigó la presencia de anticuerpos contra OROV, por medio de la técnica de Mac-ELISA, utilizando antígenos específicos para OROV (reactivos cedidos por el Dr. Vasconcelos del Instituto Evandro Chagas, de Belem, Brasil). Se encontraron 8 sueros de pacientes reactivos para OROV, proveniente de las provincias de Formosa, Salta y Jujuy. Estos resultados preliminares permitieron evidenciar, serológicamente, la presencia de OROV en la región norte de Argentina (32).

En el año 2005 se detectó, material genético en 5 muestras de pacientes provenientes de la provincia de Jujuy, utilizando la técnica de rt-PCR, y mediante la secuenciación de parte del genoma viral se demostró la presencia genotipo IV del OROV (3). Este fue el último registro sobre la posible circulación de OROV en la provincia y en Argentina. En el 2010 fue reconocido un brote humano por OROV en Perú (29), hecho que ocurrió casi simultáneamente a la recolección de las muestras correspondientes a este estudio. Situación que tiene importancia ya que el movimiento de las personas

en nuestra provincia, con un alto intercambio a nivel de la frontera con Bolivia con fines comerciales o turísticos, conecta a la provincia con la región andina y aumenta el riesgo de introducción de agentes patógenos. El ingreso de individuos en fase de viremia, ya sea subclínica o con sintomatología, suele ser un modo habitual de introducción de enfermedades trasmitidas por vectores que ha sido identificado en ocasiones anteriores ej. para dengue.

El trabajo se dividió en dos etapas generales. La primera consistió en la recolección y almacenamiento de las muestras provenientes de los diferentes laboratorios que conforman la red de salud pública de la provincia, e investigación de la infección de virus dengue. Se utilizaron dos técnicas para detección de virus dengue: como tamizaje, un ELISA para investigar la presencia del Antígeno NS1 y luego rt-PCR de punto final y rt-PCR en tiempo real, para estudiar la presencia de material genético. En el inicio del trabajo se utilizó la técnica de rt-PCR de punto final, luego se optó por utilizar la técnica de tiempo real, por resultar más rápida, permitir procesar un mayor número de muestras por prueba y además contar con un sistema de detección más objetivo y sensible. Durante el período de tiempo en donde se tomaron las muestras para esta investigación se denunciaron al menos 384 casos de pacientes con síndromes febriles inespecíficos, en los cuales se sospechaba de una infección por virus dengue, que resultaron negativos para dicho virus. Según el algoritmo de trabajo de la red de laboratorios nacionales para el diagnóstico de virus dengue (40), aquel paciente al que se le estudia una muestra de suero de menos de 5 días, proveniente de un paciente con un cuadro de síndrome febril inespecífico y que presente resultados “no reactivo” para NS1 Ag o “no detectable” para PCR virus dengue debe ser interpretado como un “RESULTADO NO CONCLUSIVO”, que no permite descartar la infección. Existen muchos casos en los que no resulta factible el estudio de una segunda muestra por dificultad en la localización de las personas o por renuencia de las mismas, al haber remitido el cuadro clínico. Esta es una dificultad que enfrentan los sistemas de vigilancia de agentes virales que requieren estudio de pares serológicos con las metodologías diagnósticas actualmente disponibles. No obstante, en las muestras estudiadas para OROV no se ha evidenciado presencia de genoma de virus dengue (rt- PCR) ni la presencia de antígenos virales de dengue (ELISA NS1) que podrían ser menos susceptibles a las condiciones de conservación de la muestra. La segunda etapa contempló la investigación por rt-PCR de punto final del OROV en todas las muestras que presentaron resultado negativo a virus dengue. En las muestras más antiguas o que puedan prestar alguna duda en su transporte o conservación se investigó la presencia de la RNasa P humana por rt-PCR en tiempo real. No se efectuó esta investigación a todas las muestras, por ser un estudio de elevado costo y que no se utiliza de forma rutinaria en el diagnóstico de los arbovirus en nuestro laboratorio.

La elección de la rt-PCR como técnica para la investigación de OROV se centró en la posibilidad de contar con un método directo de investigación que permitiera la confirmación de la infección, situación más compleja mediante el uso de técnicas serológicas, por requerir par serológico. El detectar una muestra con material genético viral, permitiría estudios filogenéticos posteriores o la posibilidad de intentar el aislamiento viral. Es importante comentar que en el país no se cuenta con cepas virales de OROV por lo que no existe la posibilidad de producir antígenos por las metodologías convencionales habitualmente usada para arbovirus, tales como los métodos de sacarosa-acetona aplicado en cerebro de ratones lactantes o por procesamiento de cultivos celulares infectados. Esta situación limita la implementación de técnicas serológicas caseras (in-house) y restringe las posibilidades de diagnóstico, ya que además en el mercado no se cuenta con equipos comerciales para la detección de infecciones por este agente.

Estudios con similar metodología permitieron evidenciar la circulación de virus Oropouche, inclusive estudiando tamaños muestrales menores. Por ej. en la ciudad de Acre (Brasil) se analizaron 68 muestras agudas de pacientes con síndromes febriles inespecíficos detectados en el periodo de marzo de 2004 a octubre del 2006 y se encontró un paciente positivo, demostrando la existencia de infecciones esporádicas en regiones donde ya había existido un brote de OROV varios años antes (41).

Este tipo de patologías son de tipo epidémico y cuando se producen dan lugar a muchos casos, con altas tasas de ataque, como ejemplo se puede citar el caso del brote encontrado en la ciudad de Manaos perteneciente al estado de Amazonas, Brasil. Entre enero de 2007 y noviembre de 2008 se investigó por método de MAC-ELISA 631 muestras de pacientes con síndromes febriles inespecíficos, encontrando 128 sueros positivos para Ig M contra OROV, alrededor del 20% de las muestras estudiadas (42).Teniendo en cuenta los resultados previos descriptos entre 10/2002-5/2003 (32) y de acuerdo a ellos considerando un intervalo de confianza de 95%, en caso de haber existido un brote podrían haberse encontrado una prevalencia de entre 1,62 y 8,32%. Es por eso que estudiamos una cantidad de 160 muestras.

El estudio realizado no evidenció circulación de OROV durante el período que abarcó esta investigación. Las condiciones ecológicas que posibilitarían ciclos locales de transmisión viral, la movilización de personas a regiones cercanas del área andina o amazónica de riesgo, y las evidencias previas de circulación viral en la provincia de Jujuy, indican que se requiere sostener una estrategia de vigilancia para el OROV en la provincia. Es necesario continuar con el estudio de aquellos síndromes febriles que quedan sin etiología identificada y estudios ecológicos que pudieran revelar componentes de los ciclos de trasmisión en la región de modo de poder implementar acciones adecuadas tendientes a su prevención y control. Además

resultaría importante ampliar la vigilancia de OROV en cuadros con presentación clínica neurológica que no tienen diagnóstico, ya que no sabemos qué comportamiento pudieran tener las cepas circulantes que pudiéramos detectar en Argentina (27). También podríamos considerar la posibilidad de realizar encuestas serológicas que midan anticuerpos IgG (idealmente por neutralización) como una estrategia para evidenciar la existencia de cepas virales circulantes de baja patogenicidad que hasta el momento no han dado impacto en salud pública.

8. Bibliografía

1- P. S.; Boorman, J. & Baylis, M. Culicoides Biting Midges:Their role as Arbovirus vectors.Mellor,., 2000. Ann. Rev. Entomol. 45:307-340.

2- AJ Shelley, S Coscarón. Simuliid Blackflies (Diptera: Simuliidae) and Ceratopogonid Midges (Diptera: Ceratopogonidae) as Vectors of Mansonella ozzardi (Nematoda: Onchocercidae) in Northern Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 96(4): 451-458, May 2001.

3- Fabbri, C; Morales, M; Baroni, P; Levis, S; Enria, D; Rodrigues, S; Martins, L; Nunes, M; , P; Ramirez, J; Martinez, A; Fasendini, B; Ubeid, C; Ripoll, C. "Primeras evidencias de circulación de virus Oropouche en Argentina" VIII Congreso Argentino de Virología, 19 al 25 de setiembre de 2005, Buenos Aires, Argentina

4-Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball,L. A. Bunyaviridae. In: Virus Taxonomy Classification and Nomeclature of Viruses. Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Virology Division. International Union of Microbiological Societies. Elsevier, Academic Press, p. 695-699, 2005.

5- Manfred Weidmann, Veronique Rudaz, Marcio R. T. Nunes, Pedro F. C. Vasconcelos,and Frank T. Hufert. Rapid Detection of Human Pathogenic Orthobunyaviruses. Journal of Clinical Microbiology, july 2003, p. 3299–3305 vol. 41, no. 7.

6-Peter M., MD Howley (Editor), Diane E., Ph.D. Griffin (Editor), Robert A., Ph.D. Lamb (Editor), Malcolm A., MD Martin (Editor), Bernard Roizman (Editor), Stephen E., MD Straus (Editor), David M., Ph.D. Knipe (Editor), Fields - Virology (Two Volumes) 4th Edition (August 2001): by Bernard N. Fields (Editor), By Lippincott Williams & Wilkins Publishers

7-Kinney, r. m., Calisher, C. H. Antigenic relationships among Simbu serogroup (Bunyaviridae) viruses. American Journal of Tropical Medicineand Hygiene, 30: 1307-1318, 1981.

8-Murphy, F. A. Virus Taxonomy. In: Virology. Fields, B. N., Knipe, D. M.,Howley, P. M. (eds.). Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1996. p. 15-57.

9-Buchen-Osmond, C. Bunyaviridae. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 3. ICTVdB Management, The Earth Institute, Biosphere 2 Center, Columbia University, Oracle, AZ, USA, 2003, 853 p.

10-Vasconcello Helena. Epidemiologia Molecular de Virus Oropouche (*bunyaviridae: orthobunyavirus*) en Amazonia Brasilera. Tesis doctoral presentada en el Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad Federal de Pará. Octubre 2009.

11-Saeed, M. F., Nunes, M., Vasconcelos, P. F. C., Travassos Da Rosa, A. P. A., Watts, D. M., Russell, K., Shope, R. E., Tesh, R. B.,Barrett, A. D. T. Diagnosis of Oropouche virus infection using a recombinant nucleocapsid protein-based enzyme immunoassay. Journal of Clinical Microbiology. v. 39, n. 7, p. 2445 - 2452, 2001.

12-Aquino, V. H., Moreli, M. L., Moraes-Figueiredo, L. T. Analysis of Oropouche virus L protein amino acid sequence showed the presence of an additional conserved region that could harbor an important role for the polymerase activity. Archives of Virology, 148: 19-28, 2003.

13-Aquino, V. H., Figueiredo, L. T.M. Linear amplification followed by single primer polymerase chain reaction to amplify unknown DNA fragments: complete nucleotide sequence of Oropouche virus M RNA segment. Journal of Virological Methods, 115: 51-57, 2004.

14-Saeed, M. F., Wang, H., Nunes, M. R. T., Vasconcelos, P. F. C.,Weaver, S. C., Shope, R. E., Watts, D. M., Tesh, R. B., Barrett, A. D. T. Nucleotide sequences and phylogeny of the nucleocapsid gene of Oropouche virus. Journal of General Virology, 81: 743-748, 2000.

15-Helena Baldez Vasconcelos, Márcio R.T. Nunes, Lívia M.N. Casseb, Valéria L. Carvalho, Eliana V. Pinto da Silva, Mayra Silva, Samir M.M. Casseb, and Pedro F.C. Vasconcelos Molecular Epidemiology of Oropouche Virus, Brazil. Emerg Infect Dis. May 2011; 17(5): 800–806.

16-Degallier, N. A.; Travassos Da Rosa, A. P. A; Da Silva, J. M. C.; Rodríguez, S. G.; Vasconcelos, P. F. C.; Travassos Da Rosa, J. F. C.; Pereira Da Sliva, G. & Pereira Da Sliva, R., 1992. As aves como Hospedeiras de Arbovírus Na Amazonia Brasileira. Bol. Mus. Para Emilio Goeldi, sér. Zool. 8(1):69-111.

17-Hoch, A. L.; Roberts, D. R. & Pinheiro, F. P., 1990. Hot-seeking behaviourand seasonal abundance of Culicoides paraensis (Diptera: Ceratopogonidae) in Brasil. J. Am. Mosquito Contr. 6:110-114.

18-Mellor, P. S.; Boorman, J. & Baylis, M., 2000. Culicoides Biting Midges: Their role as Arbovirus vectors. Ann. Rev. Entomol. 45:307-340.

19-Pinheiro, F. P.; Travassos Da Rosa, A. P. A.; Gomes, M. L. C.; Leduc, J. W. & Hoch, A. L., 1982. Transmission of Oropouche virus from man to hamster by the biting midge Culciodes paraensis. Science 215:1251-1253.

20-Vasconcelos, P. F. C.; Travassos Da Rosa, J. F. S.; Gerreiro, S. C.; Degallier,N; Travassos Da Rosa, S & Travassos Da Rosa, A. P. A., 1989. Primeiro registro de epidemias causada pelo virus oropouche nos estados do Maranhao e Goias. Rev. Inst. Med. Trop. 31 (4):271-278.

21-Campos R.E y Maciá A. 1998 Culicidae. En J.J Morrone, S. Coscarón (directores) Biodiversidad de Artrópodos Argentinos una perspectiva biotaxonómica. Cap 28: 291-303.

22-Helena Baldez Vasconcelos, Márcio R.T. Nunes, Lívia M.N. Casseb, Valéria L. Carvalho, Eliana V. Pinto da Silva, Mayra Silva, Samir M.M. Casseb, and Pedro F.C. Vasconcelos. Molecular Epidemiology of Oropouche Virus, Brazil. Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • Vol. 17, No. 5, May 2011.

23-Anderson CR, Spence L, Downs WG, Aitken THG. Oropouche virus: a new human disease agent from Trinidad. West Indies. Am J Trop Med Hyg. 1961;10:574–8.

24-Pinheiro FP, Pinheiro M, Bensabath G, Causey OR, Shope RE. Epidemia de vírus Oropouche em Belém. Rev Serv Esp Saúde Públ. 1962;12:15–23.

25-Chávez R., Colán E, Phillips I. Fiebre de Oropuche en Iquitos: Reporte preliminar de 5 casos.Rev Farmacol Terap (Lima). 1992; 2(1): 12-14.

26-Pinheiro, F. P., Travassos Da Rosa, A. P. A., Vasconcelos, P. F. C. Oropouche fever. In: Textbook of Pediatric Infectious Diseases. Feigin, R. D. (ed.). Saunders, Philadelphia. 2004. p. 2418-2423.

27-Michele de Souza Bastos, Luiz Tadeu Moraes Figueiredo, Felipe Gomes Naveca, Rossicleia Lins Monte, Natalia Lessa, Regina Maria Pinto de Figueiredo, Joao Bosco de Lima Gimaque, Guilherme Pivoto Joao, Rajendranath Ramasawmy, and Maria Paula Gomes Mourao. Short Report: Identification of Oropouche Orthobunyavirus in the Cerebrospinal Fluid of Three Patients in the Amazonas, Brazil. Am. J. Trop. Med. Hyg., 86(4), 2012, pp. 732–735.

28-Pedro P. Alvarez-Falconi y col. Brote de Fiebre de Oropuche en Bagazán, San Martín-Perú: Evaluación Epidemiológica, Manifestaciones Gastrointestinales y Hemorrágicas Rev. Gastroenterol. Perú; 2010; 30-4: 334-340.

29-Sara Castro, Luis Banda, Dilthey Cabellos, Deysi Luna, Juan Muñoz, Yudy Cley Condor. Brote de fiebre de Oropuche en dos localidades de la región Cajamarca, Perú, 2011. Rev. Peru. Epidemiol. Vol 17 no 3 Diciembre 2013

30-Stephen R. Manock , Kathryn H. Jacobsen ,* Narcisa Brito de Bravo , Kevin L. Russell , Monica Negrete , James G. Olson , José L. Sanchez , Patrick J. Blair , Roger D. Smalligan , Brad K. Quist , Juan Freire Espín , Willan R. Espinoza. Etiology of Acute Undifferentiated Febrile Illness in the Amazon Basin of Ecuador. *Am. J. Trop. Med. Hyg.,* 81(1), 2009, pp. 146–151

31-Brett M. Forshey, Carolina Guevara, V. Alberto Laguna-Torres, Manuel Cespedes, Jorge Vargas, Alberto Gianella, Efrain Vallejo, Ce´ sar Madrid, Nicolas Aguayo, Eduardo Gotuzzo, Victor Suarez, Ana Maria Morales, Luis Beingolea, Nora Reyes, Juan Perez, Monica Negrete, Claudio Rocha, Amy C. Morrison, Kevin L. Russell, Patrick J. Blair, James G. Olson, Tadeusz J. Kochel, Fiona MacCormick , Lila C. Fleming , and Tadeusz Kochel. Arboviral Etiologies of Acute Febrile Illnesses in Western South America, 2000–2007. www.plosntds.org, August 2010, Volumen 4, (8), pp 787

32-Ripoll Carlos. “infecciones por arbovirus en la provincia de Jujuy”. Presentación en el ministerio de Salud de la provincia de Jujuy. Octubre 2004. ww.msaludjujuy.gov.ar/Infectologia/docs/zoonosis/Arbovirus.pdf

33-Ing. Luis Guillermo Buitrago, El Clima de la Provincia de Jujuy cátedra de climatología y fenología agrícolas Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Jujuy San Salvador de Jujuy – Argentina. ISBN: 950-721-114-4, II Edición, año 1999.

34-V° Reunión Ordinaria del Consejo Federal de Salud San Salvador de Jujuy, 27 y 28 de agosto de 2010. www.msal.gov.ar/images/stories/cofesa/2010/acta-05-10/anexo-9_pcia-de%20jujuy.pdf

35-Tutorial para la notificación del evento dengue a través del SIVILA. Dirección de Epidemiología – Sistema de Vigilancia Laboratorial SIVILA. http://www.msal.gov.ar/images/stories/epidemiologia/vigilancia/sivila/tutoriales/dengue-tutorial-notificacion-traves-sivila-2009.pdf.

35-Platelia Dengue NS1 Ag, Detección cualitativa o semicuantitativa del antígeno NS1 del virus del dengue en suero o en el plasma humano mediante el método inmunoenzimático.

36-Protocolo del CDC para el RT-PCR en tiempo real para el nuevo subtipo del virus de influenza A (H1N1)28 de abril de 2009. Revisión 1 (30 de abril de 2009).
www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCrealtimeRTPCRprotocol_20090428.pdf.

37-Lanciotti, Charles h. Calisher, Duane j. Gubler, Gwong-jen Chang, and a. Vance Vorndam Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. journal of clinical microbiology, Mar. 1992, p. 545-551 Vol. 30, No. 3.

38-Barbara W. Johnson,* Brandy J. Russell, and Robert S. Lanciotti .Serotype-Specific Detection of Dengue Viruses in a Fourplex Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay. Accepted 26 July 2005.

39-Mohammad F. Saeed,, Heiman Wang, Marcio Nunes, Pedro F. C. Vasconcelos, Scott C. Weaver, Robert E. Shope, Douglas M. Watts, Robert B. Tesh and Alan D. T. Barrett Nucleotide sequences and phylogeny of the nucleocapsid gene of Oropouche virus. Journal of General Virology (2000), 81, 743–748.

40-Enfermedades infecciosas | dengue Guia para el equipo de salud. Nro. 2 (3ra. edición). Dirección de Epidemiología - Ministerio de Salud de la Nación, República Argentina Web: www.msal.gov.ar.Impresión: Año 2013.w.msal.gov.ar.Impresión: Año 2013.

41- Ana Carolina Bernardes Terzian, Roberta Vieira de Moraes Bronzoni, Betânia Paiva Drumond, Mônica Da Silva-Nunes, Natal Santos da Silva, Marcelo Urbano Ferreira, Márcia Aparecida Sperança, and Maurício Lacerda Nogueira. Sporadic Oropouche Virus Infection, Acre, Brazil. Emerging Infectious Diseases Vol. 15, No. 2, February 2009.

42- Maria Paula G. Mourão, Michelle S. Bastos, João Bosco L. Gimaque, Bruno Rafaelle Mota, Giselle S. Souza, Gustavo Henrique N. Grimmer, Elizabeth S. Galusso, Eurico Arruda, and Luiz Tadeu M. Figueiredo. Oropouche Fever Outbreak, Manaus, Brazil, 2007–2008. Emerging Infectious Diseases Vol. 15, No. 12, December 2009.

9. Anexos

9.1 Anexo 1 Aprobación del comité provincial de bioética

Ministerio de
Salud

Ref. Investigación de virus Oropouche por RT-PCR desde noviembre del 2009 a enero del 2011 en la Provincia de Jujuy

Previo análisis y evaluación de los criterios científicos y éticos del Protocolo de Investigación presentado por el Lic. Ariel Fridman, se informa que:

Objetivo: Investigar si existe actualmente circulación de virus Oropouche en Jujuy, utilizando la técnica de rt-PCR.

Investigadores responsable. Lic. Ariel Fridman

Criterios de inclusión y exclusión: Detallados y claros.

Consentimiento informado: No es necesario por trabajar con muestras de laboratorio

Beneficio para el participante: Directo ninguno.

Criterios éticos jurídicos del estudio: Todas las investigaciones que se realizan en la Provincia de Jujuy, se enmarcan en Resolución N° 12565-S-13 Procedimiento de Evaluación y Registro de las Investigaciones de la Salud; Resolución N° 11039-S-13 ratificatoria de la Resolución N°3-DGIS-12, de Adhesión a la Resolución 1480/11, Guía para Investigaciones con Seres Humanos y Disposición N° 6677. Régimen de Buenas Prácticas para Investigación en Farmacología Clínica de la ANMAT del Ministerio de Salud de la Nación.

No han existido conflictos de intereses.

San Salvador de Jujuy, Abril 15 del 2014

MINISTERIO DE SALUD COMITÉ PROVINCIAL DE BIOETICA JUJUY

Dra. Maria de La Paz Bossio

Evaluadora

DIRECCION GENERAL DE INVESTIGACION DE LA SALUD
COMITÉ PROVINCIAL DE BIOETICA DE JUJUY
AREA DE EVALUACION ETICA DE LAS INVESTIGACIONES

9.2 Anexo 2 Ficha Vigilancia de Síndromes Febriles

SF
anverso

VIGILANCIA DE SINDROME FEBRIL
PLANILLA CLINICO-EPIDEMIOLOGICA

Definición de caso: Persona de cualquier edad y sexo que presenta fiebre, de menos de siete (7) días de duración, mialgias y cefalea, sin afección de las vías aéreas superiores y sin etiología definida.

1. DATOS DEL PACIENTE

Apellido y nombres:_____

Fecha de nacimiento ____/____/____ Edad: _____ Sexo: M ( ) F ( ) DNI: _____

Domicilio actual:_____ Tel. propio o vecino:_____

Referencia de ubicación domicilio:_____ Localidad_____

Urbano ( ) Rural ( ) Departamento_____ Provincia_____

2. INFORMACIÓN CLINICA

Fecha de inicio de la fiebre: ____/____/____ Fecha de toma de muestra 1: ____/____/____ Muestra 2: ____/____/____

	Si	No	Ign.		Si	No	Ign.		Si	No	Ign.
Fiebre (..... 38° C)				Dolor abdominal				Edema bipalpebral			
Cefalea				Inyección conjuntival				Hepatomegalia			
Mialgias				Tos				Esplenomegalia			
Artralgias				Disnea				Oligoanuria			
Dolor retro ocular				Taquipnea				Sind. confusional			
Erupción				Prurito				Sind. meningeo			
Náuseas				Ictericia				Sind. Hemorrágico*			
Vómitos				(*) Especificar (marcar con una cruz): petequias...; púrpura....; epistaxis...; gingivorragia...;							
Diarrea				hemoptisis.....,melena....; vómitos negros...; otros.....							

Tensión: MIN ...../MAX..... **Pulso:**...../min. **Prueba del torniquete**: POS ( ) NEG ( ).FR...../min

Hto:.....% GB:...../mm3. Fórmula: ...../...../...../...../..... Plaq:...../mm3. VSG:.....mm

3. DATOS EPIDEMIOLOGICOS

Ocupación de riesgo:_____ Lugar de trabajo: Urbana ( ) Periurb ( ) Rural ( ) Silvestre ( )

Viajó durante los últimos 45 días? Si ( ) No ( ) Fecha: __/__/__ Destino_____

Estuvo en el campo, monte, lugar de recreación? Si ( ) No ( ) Fecha: __/__/__ Lugar_____

Conoce casos similares? Si ( ) No ( ) Quién/es? _____

ANTECEDENTE DE VACUNACIÓN (confirmar con carnet)

Antiamarílica: Si ( ) No ( ) Ign ( ) Última fecha de vacunación: ____/____/____

Fiebre Hemorrágica Argentina: Si ( ) No ( ) Ign ( ) Última fecha de vacunación: ____/____/____

4. SOSPECHA CLINICA EPIDEMIOLOGICA

(calificar por n° de orden) Paludismo ( ) Dengue ( ) Fiebre Amarilla ( ) Leptospirosis ( ) FHA ( ) Hantavirus ( )

Rickettsiosis ( ) Triquinosis ( ) Otros _____

Tratamiento empírico indicado (tipo y dosis)_____

5. FUENTE DE NOTIFICACION

Establecimiento:_____ Fecha de notificación: ____/____/____

Dirección_____ TeL: _____ mail_____

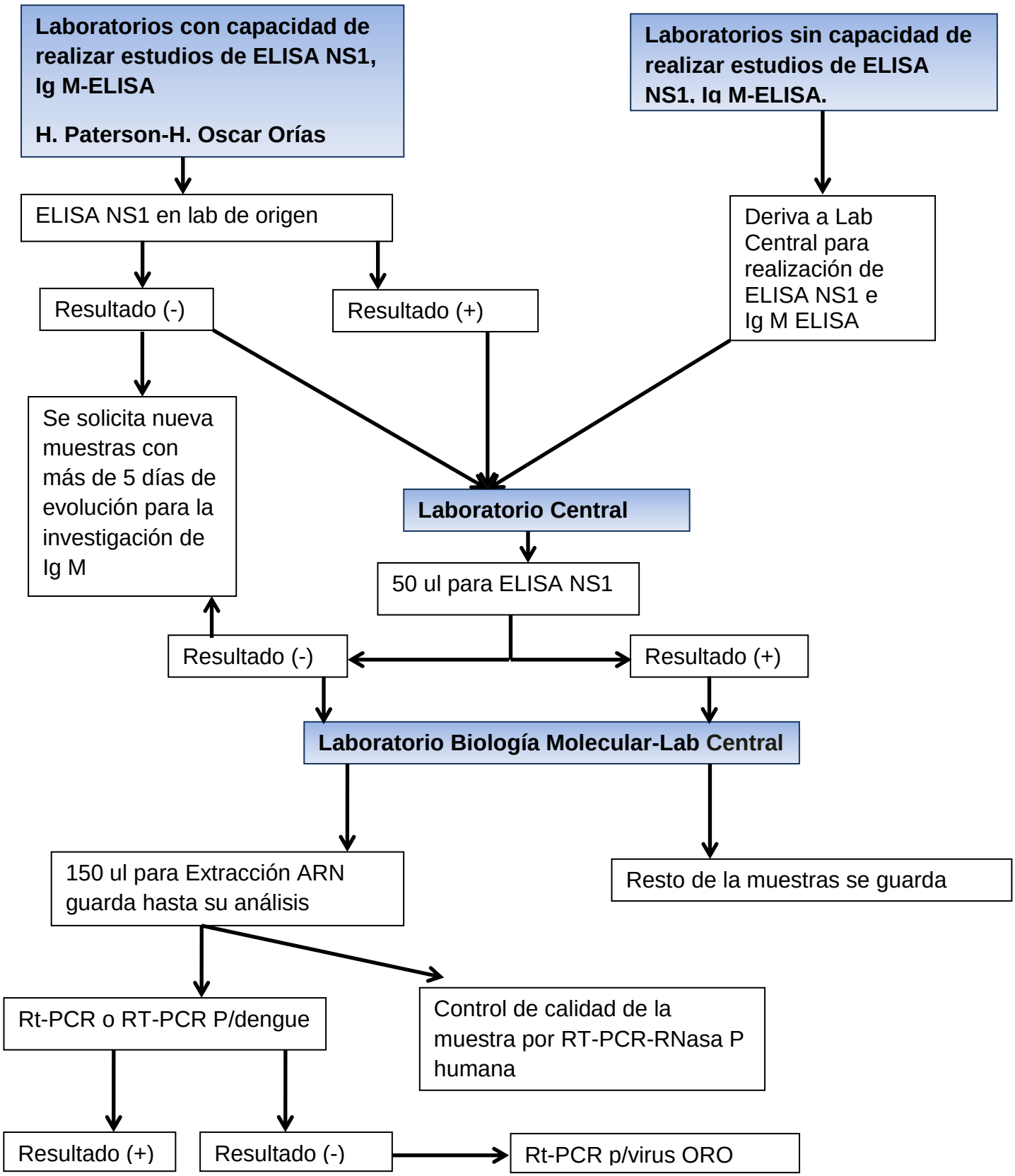
Apellido y nombre del notificador_____

6. EVOLUCION DEL CASO (se llena al alta médica)

Paciente Hospitalizado: Si ( ) No ( ) Ign ( ) Fecha hospitalización: ____/____/____

Condición del alta:_____ Fecha del alta: ____/____/____

Fecha de defunción: ____/____/____

Diagnóstico final: _____ Fecha: ____/____/____

9.3 Anexo 3 Algoritmo de procesamiento y diagnóstico virus ORO