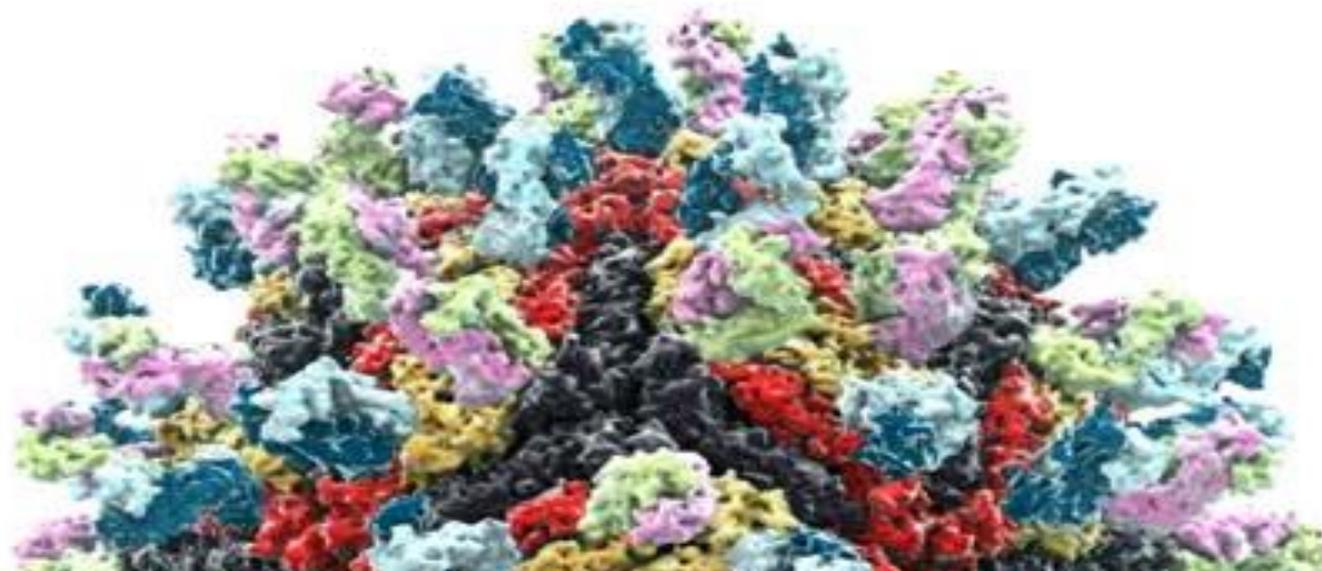


**IICS**

Instituto de Investigaciones en  
Ciencias de la Salud - UNA



Programa de Vinculación de Científicos y Tecnólogos 2017



# **TÉCNICAS DE NEUTRALIZACIÓN POR REDUCCIÓN DE PLACAS Y qPCR EN EL ESTUDIO DE FLAVIVIRUS**

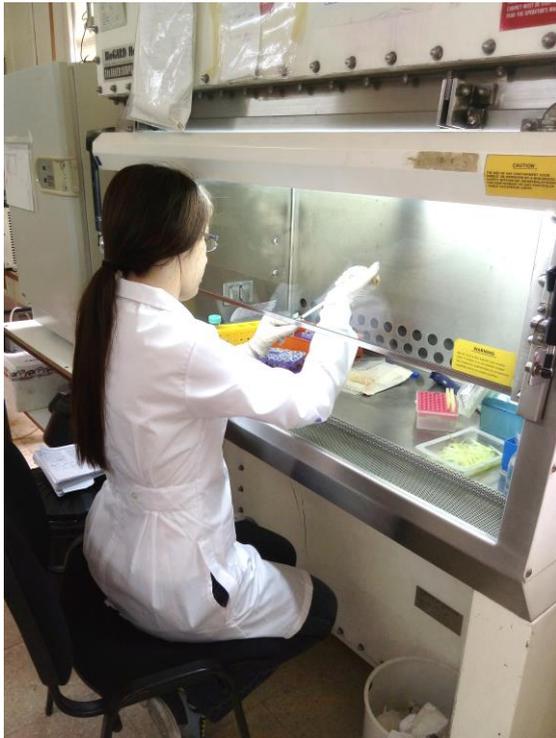


Bioq. Cynthia Bernal

# Instituto de Virología José María Vanella

Facultad de Ciencias Médicas

Universidad Nacional de Córdoba

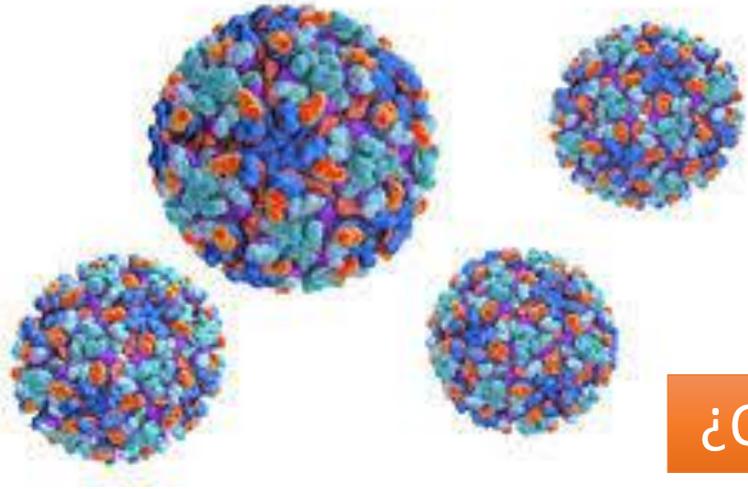


**UNC**

# Laboratorios



- ✓ Bioactividad de Productos Naturales
- ✓ Chlamydias y HPV
- ✓ Gastroenteritis Virales y Sarampión
- ✓ Hepatitis Virales
- ✓ Relación Virus – Célula
- ✓ Rubéola y Parvovirus
- ✓ Virus Linfotrópicos Humanos: Retrovirus HIV y HTLV y Poliomavirus
- ✓ Virus Respiratorios
- ✓ Virus Linfotrópicos y Herpes 6 y 7
- ✓ Cultivos Celulares
- ✓ Arbovirus



## ¿Qué son los virus?

**Son distintos a los organismos vivos**

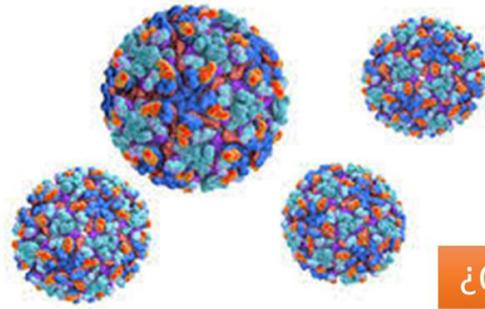
Las partículas de virus se producen a partir del ensamblaje de componentes preformados

No crecen ni se dividen

Carecen de la información genética que codifica el aparato necesario para generación de energía metabólica o para la síntesis de proteínas (ribosomas).

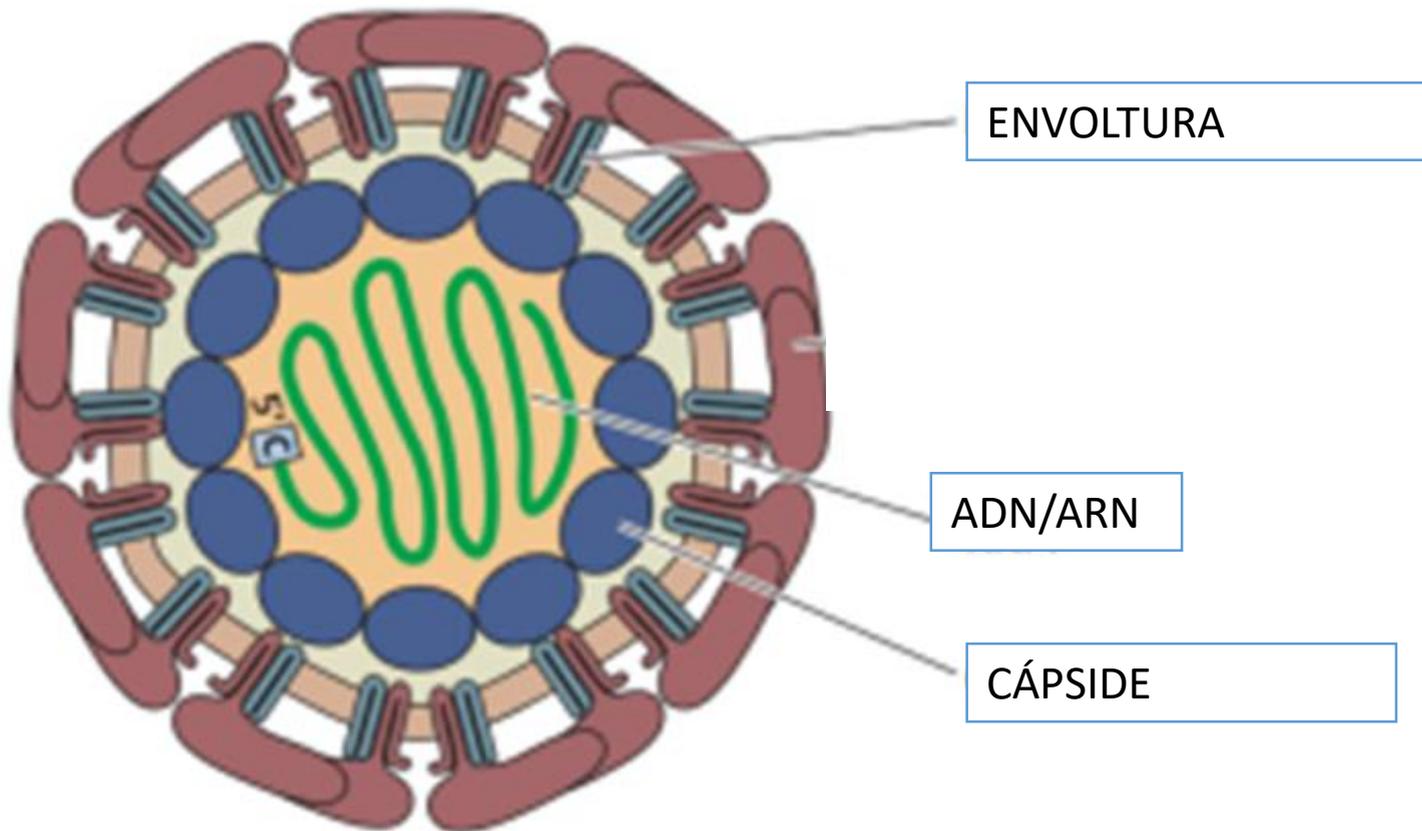
Parásitos obligados

# ¿ Los virus están vivos o no?



¿Qué son los virus?

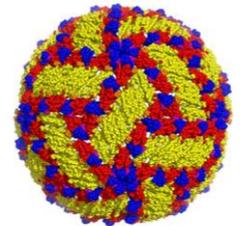
Tienen 2 o 3 componentes



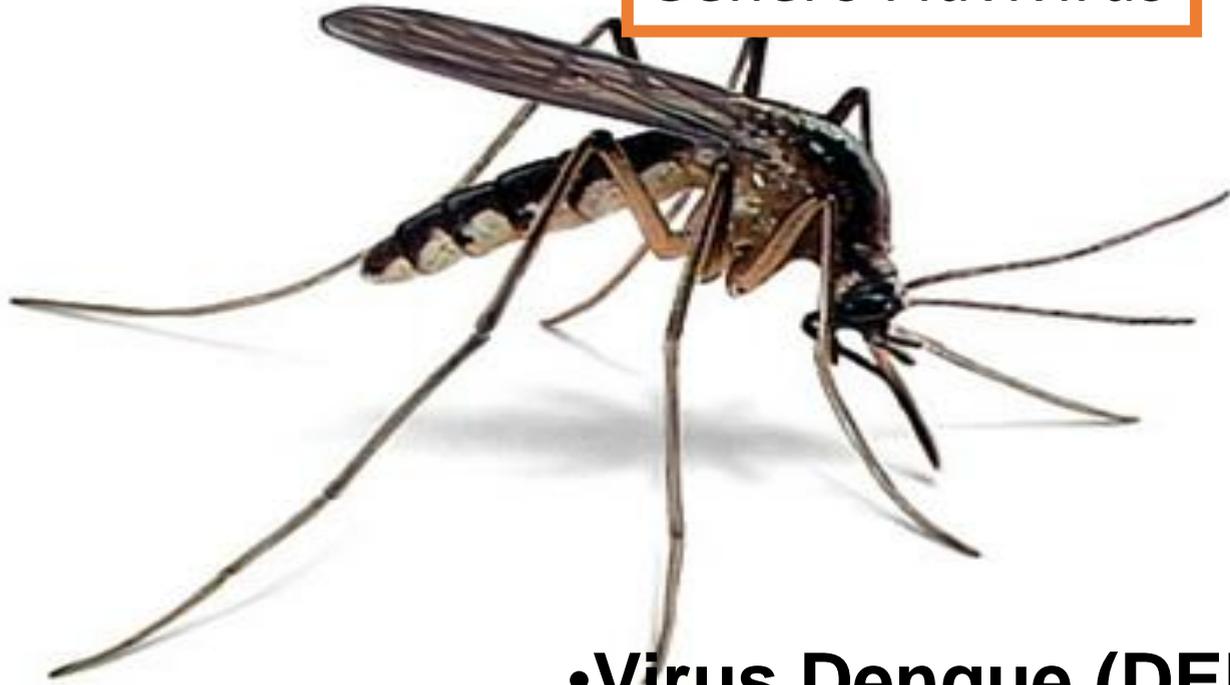
La familia *Flaviviridae*

*Género Flavivirus*

Se transmiten por los artrópodos, principalmente los mosquitos y las garrapatas



*Género Flavivirus*



- **Virus Dengue (DENV)**
- **Virus Zika (ZIKV)**
- **Virus de la fiebre amarilla (YFV)**
- **Virus de la encefalitis japonesa (JEV)**
- **Virus Río Bravo (RBV)**
- **Virus de la encefalitis de St. Louis (SLEV)**
- **Virus del Nilo Occidental (WNV)**

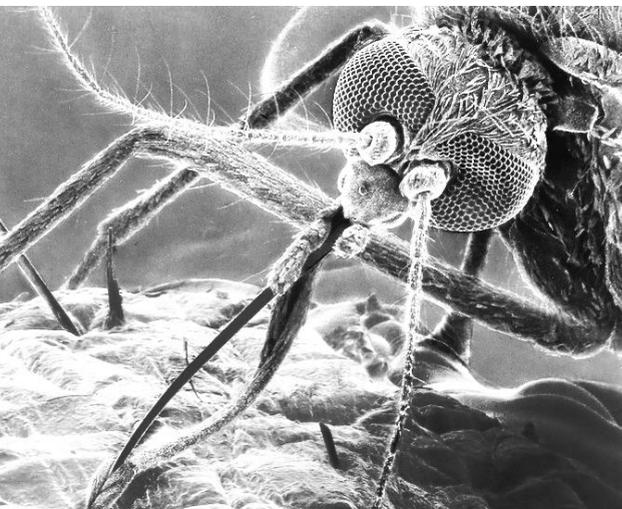
Virus de encefalitis de San Luis  
Virus del Nilo Occidental

Las infecciones clínicas varían en severidad desde enfermedades febriles leves no específicas hasta meningitis o encefalitis

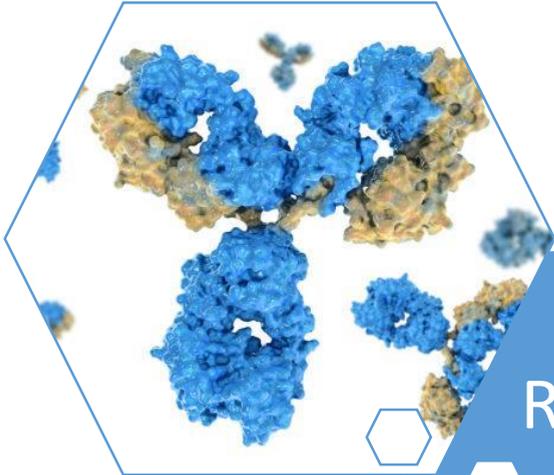
El riesgo de complicaciones graves aumenta con la edad

El rango geográfico de estos virus se extiende desde Canadá hasta Argentina

Aún no hay vacunas para prevenir la infección (SLEV, WNV)

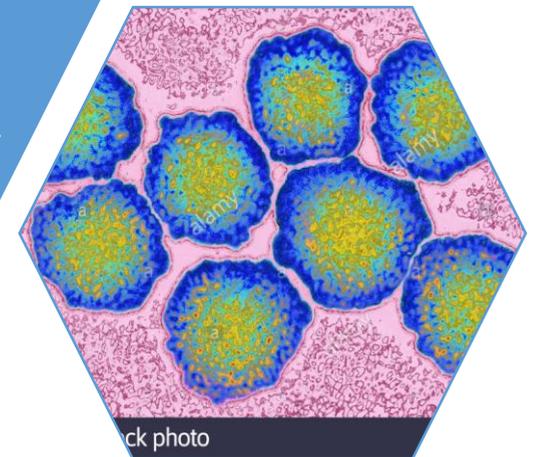


# Laboratorio

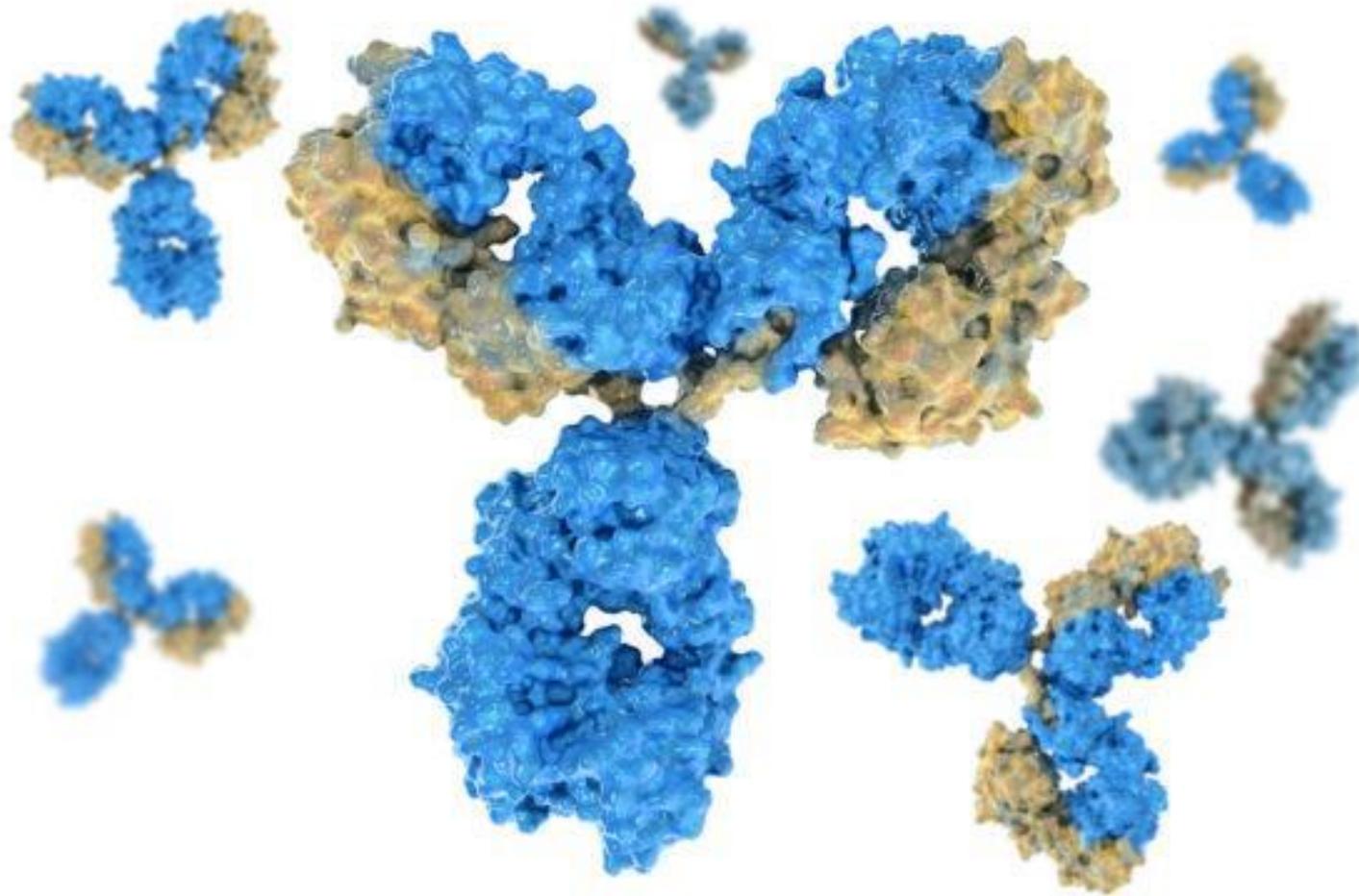


Reducción de  
placas por  
neutralización

qPCR



## Neutralización por reducción del número de placas (NRNP)



## Neutralización por reducción del número de placas (NRNP)

La **neutralización** viral se define como la **pérdida** de la capacidad infectante del virus, por la reacción del mismo con un **anticuerpo** respectivo.

## Neutralización por reducción del número de placas (NRNP)

La **neutralización** viral se define como la pérdida de la capacidad infectante del virus, por la reacción del mismo con un **anticuerpo específico**.

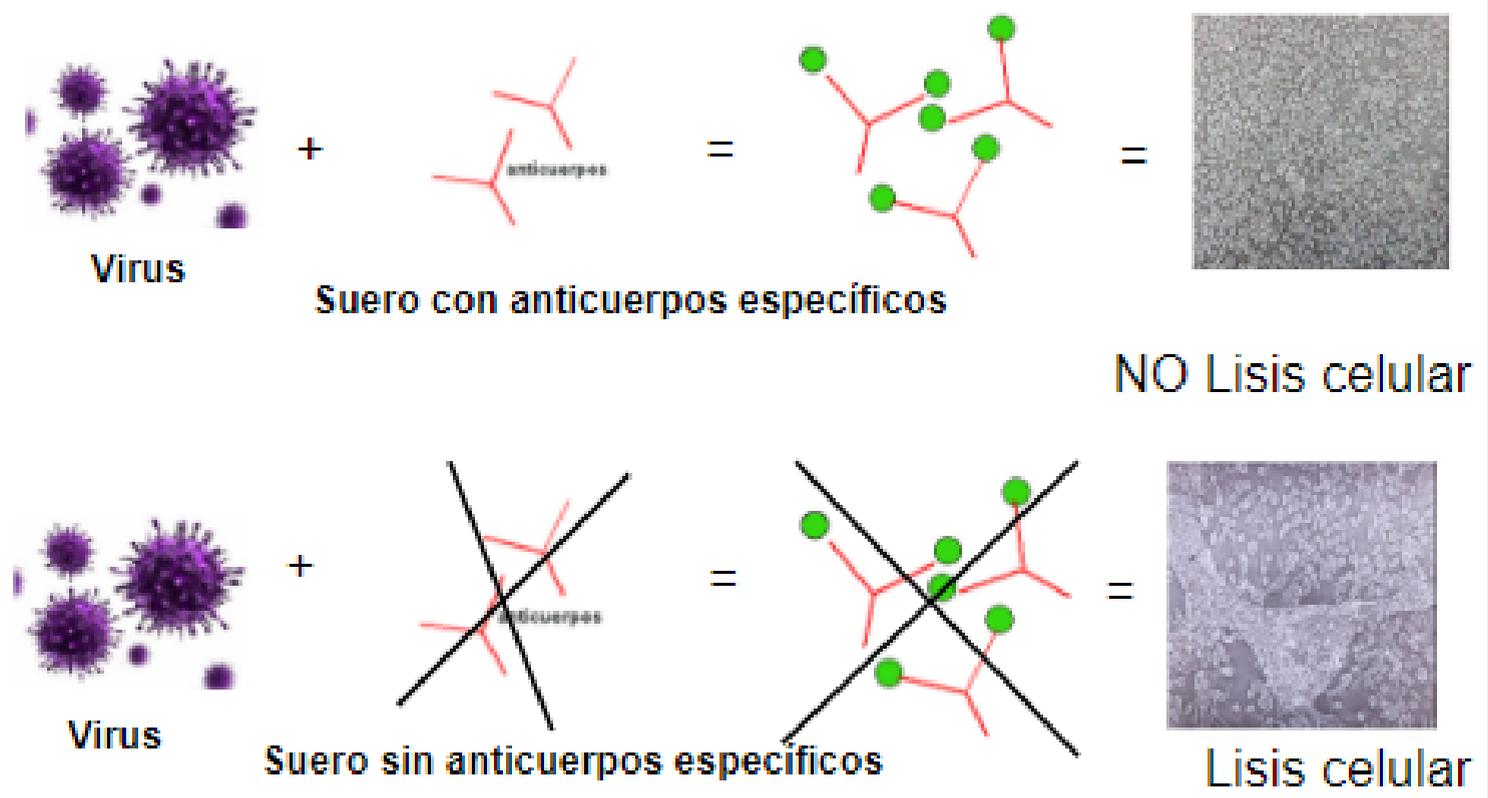
Por lo tanto,

Los **anticuerpos** protegen a las células de la destrucción por la infectividad de los virus (Rose y col., 1983; Fenner y col., 1992).

Técnica sensible y específica

# Neutralización por reducción del número de placas (NRNP)

## Neutralización



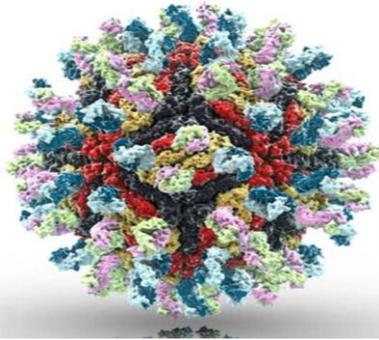
## Neutralización por reducción del número de placas (NRNP)



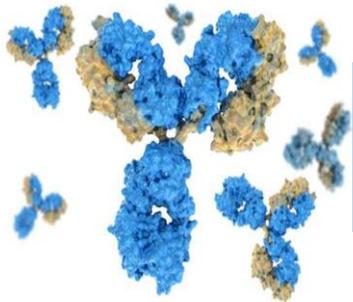
*Cómo hacerlo en el laboratorio...*

# Neutralización por reducción del número de placas (NRNP)

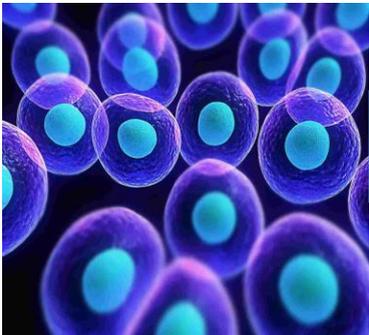
Los tres ``ingredientes`` básicos son



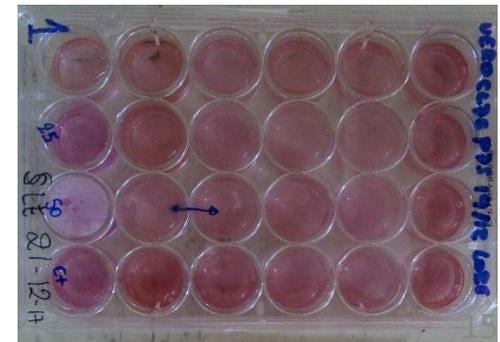
**Virus (partícula entera)** con 100 UFP, puede ser la muestra o el stock



**Suero (anticuerpos)** puede ser la muestra o un control



**Sustrato (células)** células VERO



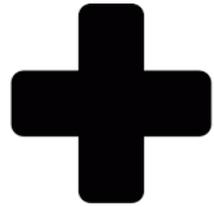
## Neutralización por reducción del número de placas (NRNP)

La mezcla de suero y virus se inocula en monocapas de células y se incuban hasta que en los cultivos control inoculados con virus aparece efecto citopático.

Los anticuerpos protegen a las células de la destrucción por la infectividad de los virus a través de la neutralización, es decir, el huésped no se infecta (Rose y col., 1983; Fenner y col., 1992);

Cuando **no** existe neutralización del virus se detecta efecto citopático (CPE), formación de placas e inhibición del metabolismo en los cultivos celulares (Specter and Lancz, 1986; Flint et al., 2000).

Suero



Virus



Adsorb virus dilutions to cell monolayer



Plaques develop in the cell monolayer

Agarose overlay

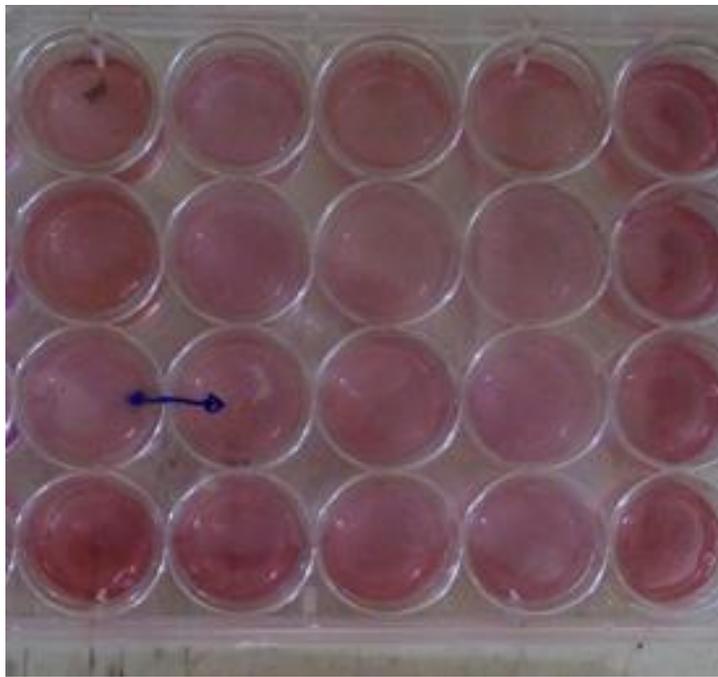


Observe for appearance of plaques



Fix and stain the cells; count plaques

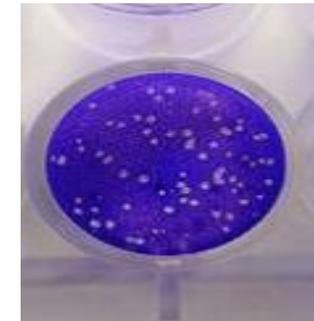




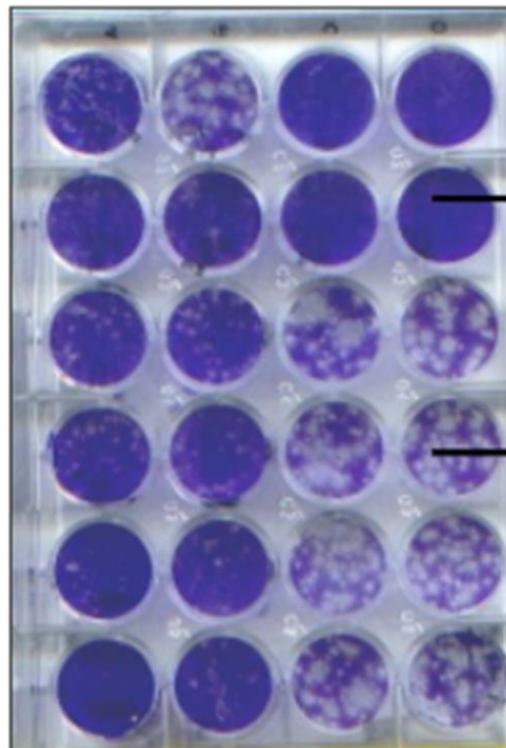
Incubación,  
fijación y tinción



No lisis



lisis



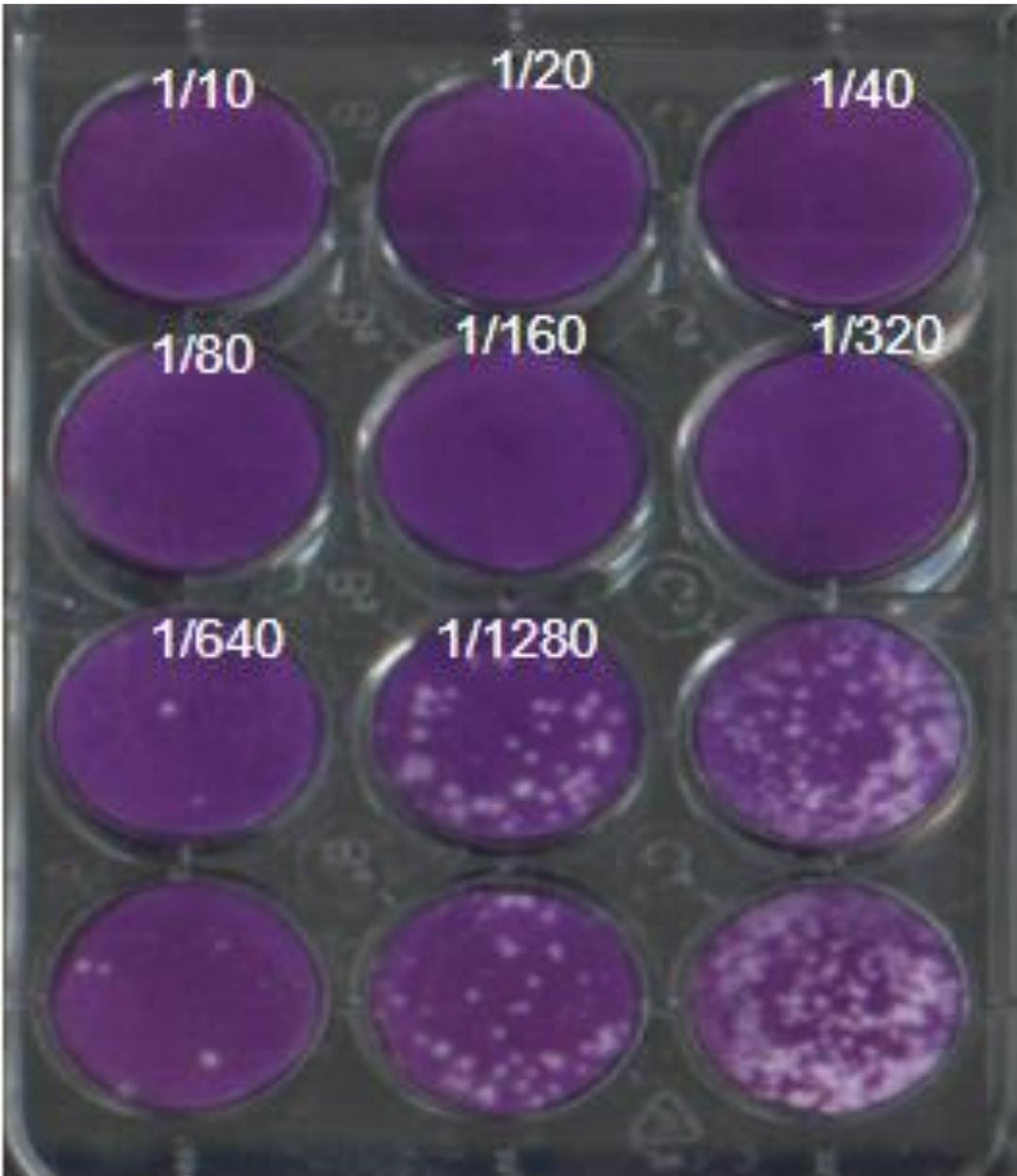
Suero Positivo: Neutraliza  
el 80% de las UFP

Suero -  
(sin Ac)

Una partícula viral infecciosa da origen a una placa  
o unidad formadora de placa (UFP).

## Neutralización por reducción del número de placas (NRNP)

Suero positivo → Titular



Suero variable + virus constante:

Título: es la mayor dilución que neutraliza el 80% de las UFP colocadas en la reacción

## Neutralización por reducción del número de placas (NRNP)

### *Objetivos de la técnica*

- a. Identificación de virus utilizando **sueros** específicos de referencia.
- b. Diagnóstico de infección viral demostrando aumentos de **títulos de anticuerpos** específicos en el curso de una enfermedad.
- c. Determinar **niveles de protección** a nivel poblacional ya que, en general, los **anticuerpos neutralizantes** persisten durante tiempo más prolongados.
- d. **Cuantificación** de virus o anticuerpos.

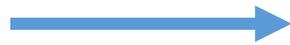


# qPCR

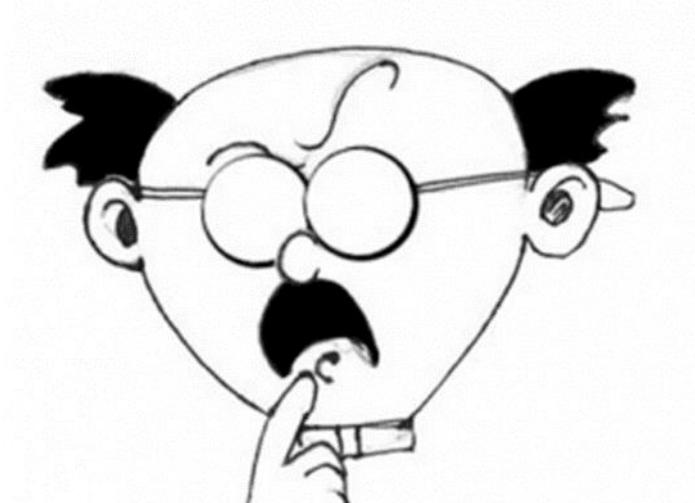
Virus de encefalitis de San Luis (SLEV)



Muestra



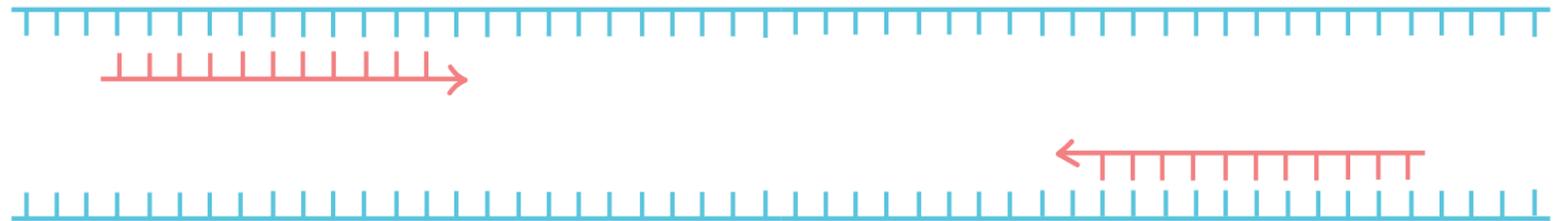
ARN viral



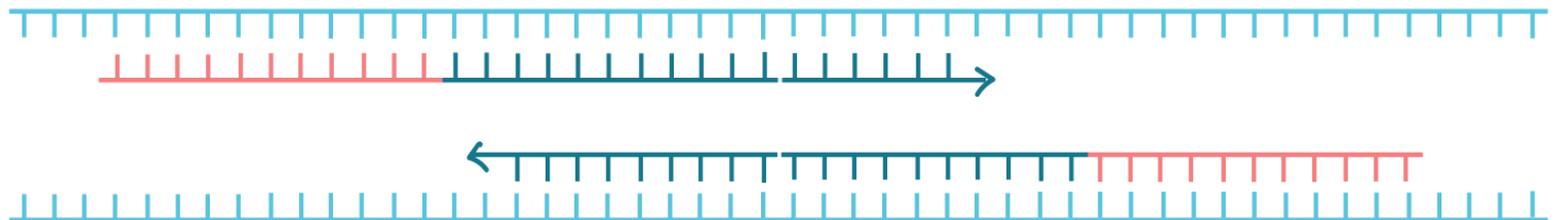
*ADN molde*

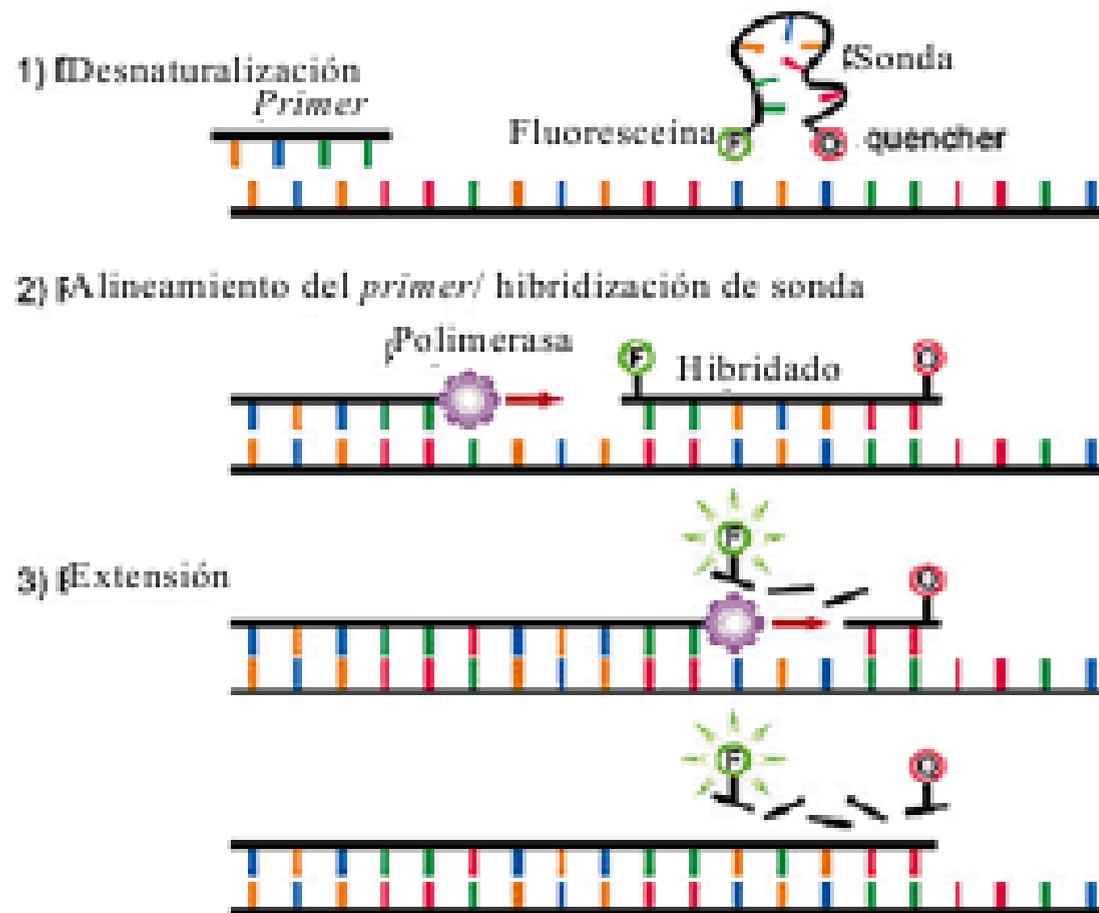


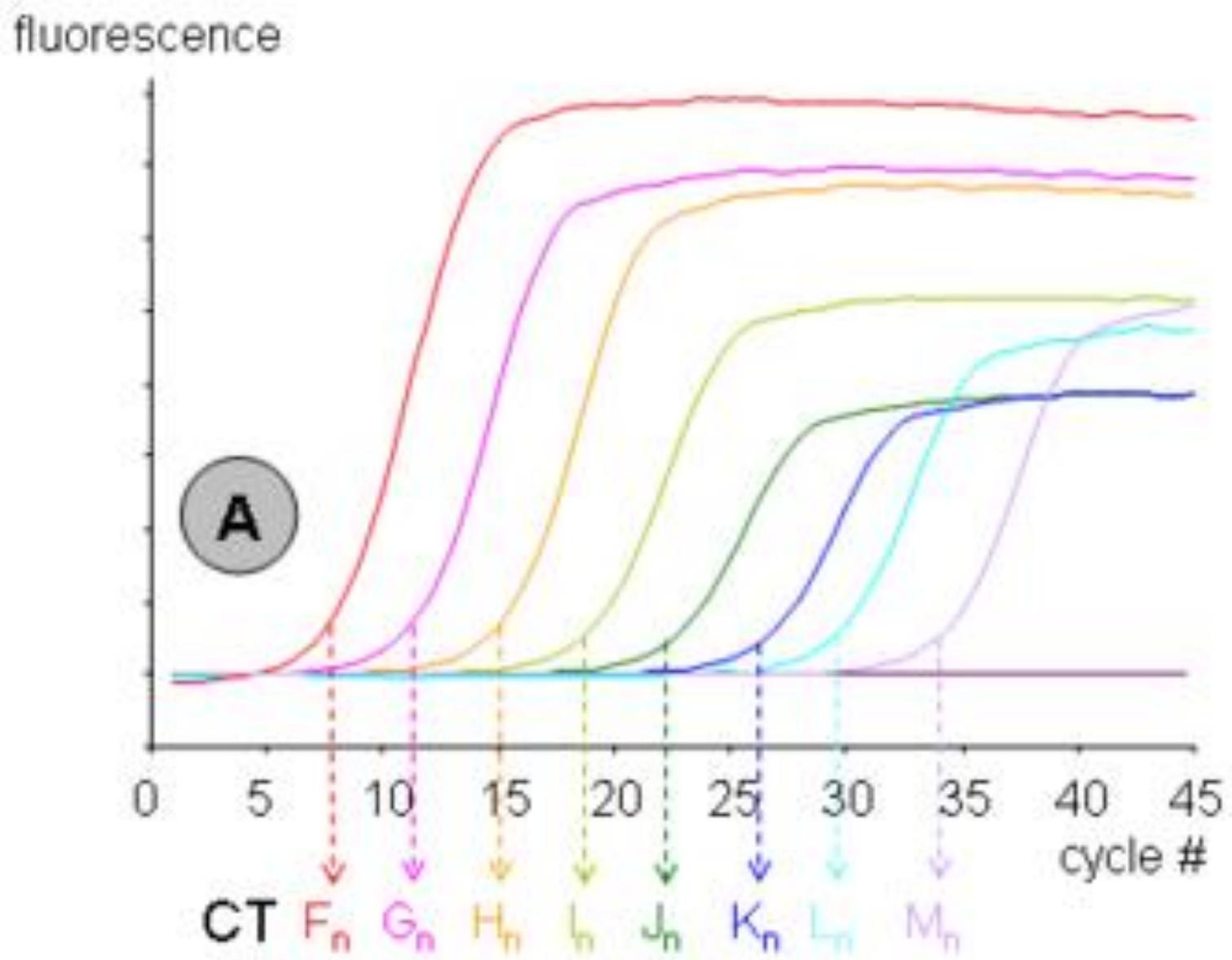
*Cebadores se unen al molde*



*Taq polimerasa extiende cebadores*



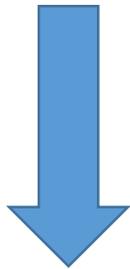




# qPCR

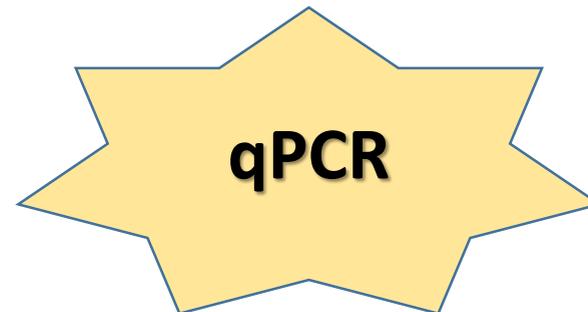
Extracción de ARN

viral DNA/RNA MiniPrep kit



Retrotranscripción

ADNc



Cuantificación: utilizando una curva patrón construida con un control.

## RETROTRANSCRIPCIÓN

- 1  $\mu\text{L}$  transcriptasa reversa
- 0.5  $\mu\text{L}$  de inhibidor de ARNsa
- 4  $\mu\text{L}$  buffer 5
- 2.4  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  25 mM
- 1  $\mu\text{L}$  random primers (10 pmol/ $\mu\text{L}$ )
- 1  $\mu\text{L}$  dNTPs (10 mM cada dATP, dCTP, dGTP, y dTTP),
- 0.1  $\mu\text{L}$  agua libre de ARNsa (final volume: 20  $\mu\text{L}$ ).

## q PCR

- 5  $\mu\text{L}$  de ADNc
- 25  $\mu\text{L}$  of a PCR mix que contiene
- 12.5  $\mu\text{L}$  of buffer 2X, 0.2  $\mu\text{L}$  de primer SLEV+1 (100  $\mu\text{M}$ ),
- 0.3  $\mu\text{L}$  de primer SLEV-1 (100  $\mu\text{M}$ ),
- 1 de  $\mu\text{L}$  de sonda TaqMan (5  $\mu\text{M}$ ),
- 1  $\mu\text{L}$  de sonda TaqMan NED (5  $\mu\text{M}$ ),
- 0.5  $\mu\text{L}$  de IC (1000 copias) y
- 9.5  $\mu\text{L}$  de agua.
- Volumen final= 30  $\mu\text{L}$

Desnaturalización inicial y activación de la polimerasa:  
95 °C por 15 min

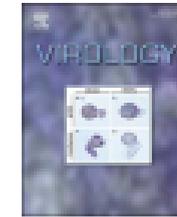


40 ciclos de 95 °C por 15 s



60 °C por 1 min





## Tissue tropism of Saint Louis encephalitis virus: Histopathology triggered by epidemic and non-epidemic strains isolated in Argentina



María Elisa Rivarola<sup>a,b,e</sup>, Guillermo Albrieu-Llinás<sup>a,b</sup>, María Belén Pisano<sup>a,b</sup>, Laura Beatriz Tauro<sup>a,b</sup>, Melisa Gorosito-Serrán<sup>b,c</sup>, Cristian Gabriel Beccaria<sup>b,c</sup>, Luis Adrián Díaz<sup>a,b</sup>, Ana Vázquez<sup>b,d,e</sup>, Agustín Quaglia<sup>a,b</sup>, Cristina López<sup>b,f</sup>, Lorena Spinsanti<sup>a,b</sup>, Adriana Gruppi<sup>b,c</sup>, Marta Silvia Contigiani<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Arbovirus, Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella", Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Enfermera Gardillo Gómez S/N. CP: 5016, Ciudad Universitaria, Córdoba, Argentina

<sup>b</sup> Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas, CONICET-Universidad Nacional de Córdoba, Av. Vélez Sarfield 1611, CP: 5016, Córdoba, Argentina

<sup>c</sup> Inmunología, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Av. Medina Allende y Haya de la Torre, CP: 5016, Córdoba, Argentina

<sup>d</sup> Instituto de Salud Carlos III, Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Infecciosas, Madrid, España

### Primers and probes used in the TaqMan qRT-PCR designed for SLEV.

Name	Sequence and labeling	Genome position
<b>Primers</b>		
SLEV-F	5'-GAGGTTAGAGGAGACCCCGC-3'	10717– 10736
SLEV-Re	5'-GTCTCCTCTAACCTCTAGTCCTTCCC- 3	10781– 10806

## Limitaciones de esta técnica



## Investigaciones realizadas





# Alerta epidemiológica:

## Casos confirmados de Encefalitis de San Luis en Ciudad de Buenos Aires, República Argentina,

### Riesgo de diseminación

(24 marzo 2010)

El 19 de marzo de 2010, el Ministerio de Salud de Argentina notificó la ocurrencia de dos casos confirmados de infección por el virus de la encefalitis de San Luis (ESL) en Ciudad de Buenos Aires. El virus de la ESL ha ocasionado brotes en la región centro del país (principalmente en las provincias de Córdoba y Entre Ríos) y es la primera vez que se detecta en la Ciudad de Buenos Aires. Este virus presenta potencial epidémico como lo demostró lo ocurrido en 1975 en los Estados Unidos, en las cuencas de los ríos Ohio y Mississippi, donde unas 2000 personas desarrollaron la forma neuroinvasiva de la enfermedad.

Casos confirmados, probables y sospechosos de Encefalitis de San Luis por provincia y localidad de residencia. Argentina, 1 de enero al 16 de marzo de 2010

Provincia	Casos confirmados	Casos probables	Casos sospechosos en estudio	Total
Buenos Aires (Bs As)		1	7	8
Ciudad de Bs As	2	4	3	9
Entre Ríos			5	5
Santa Fe			2	2
Chaco			2	2
Catamarca			1	1
Córdoba		*11	2	13
<b>Total general</b>	<b>2</b>	<b>14</b>	<b>22</b>	<b>40</b>

Fuentes: Reporte del Centro Nacional de Enlace de Argentina, 19 de marzo de 2010.

\*Notificados como positivos en espera de la confirmación por el laboratorio nacional de referencia del Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas "Dr Julio I. Maltzberg".



## West Nile Virus in Birds, Argentina

Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • Vol. 14, No. 4, April 2008

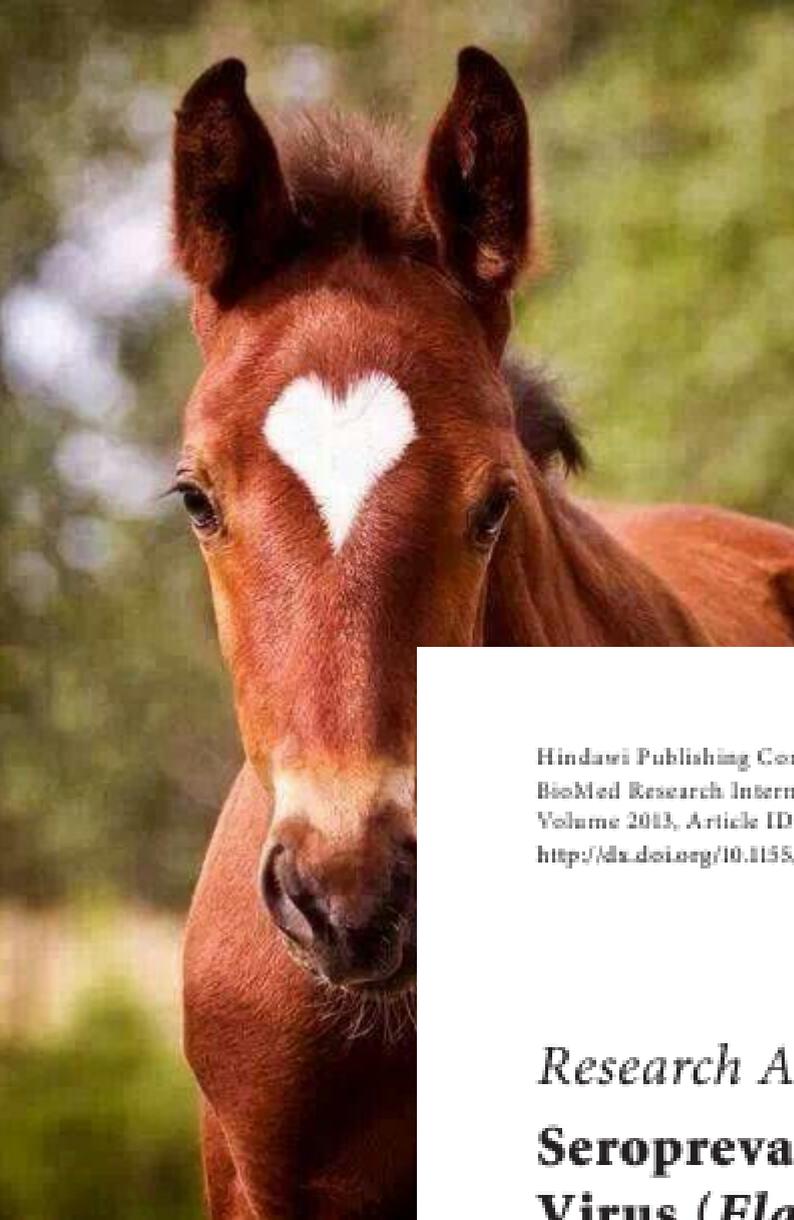
### LETTERS

Table. Prevalence of West Nile virus–neutralizing antibodies among birds grouped by taxonomic family, sampled in Chaco, Córdoba, and Tucumán Provinces, Argentina, 2004–2006\*

Bird family	No. positive	No. tested	% Positive (95% CI)	Range of PRNT <sub>50</sub> titer†
<i>Cardinalidae</i>	2	54	3.7 (1.0–12.5)	80–160
<i>Columbidae</i>	4	270	1.5 (0.6–3.8)	80–1,280
<i>Dendrocolaptidae</i>	4	17	23.5 (9.6–47.3)	320–2,560
<i>Falconidae</i>	3	5	60.0 (23.1–88.2)	320–2,560
<i>Furnariidae</i>	12	201	6.0 (3.4–10.1)	80–1,280
<i>Icteridae</i>	3	137	2.2 (0.7–6.2)	40–320
<i>Passeridae</i>	1	87	1.1 (0.2–6.2)	40
<i>Phasianidae</i>	2	8	25.0 (7.1–59.1)	320
<i>Poliaptidae</i>	2	7	28.6 (8.2–64.1)	80–640
<i>Troglodytidae</i>	1	17	5.9 (1.0–27.0)	80
<i>Turdidae</i>	8	132	6.1 (3.1–11.5)	40–1,280
<i>Tyrannidae</i>	1	370	0.3 (0.05–1.5)	160

\*Most of these families are of the order Passeriformes except for *Falconidae* (Falconiformes), *Phasianidae* (Galliformes), and *Columbidae* (Columbiformes). CI, confidence interval, determined by the Wilson score method for binomial proportions, without continuity correction.

†PRNT, plaque-reduction neutralization test. Titers are expressed as inverse of dilution.



Hindawi Publishing Corporation  
BioMed Research International  
Volume 2013, Article ID 582957, 5 pages  
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/582957>



## *Research Article*

# **Seroprevalence of St. Louis Encephalitis Virus and West Nile Virus (*Flavivirus, Flaviviridae*) in Horses, Uruguay**

**Analia Burgueño,<sup>1</sup> Lorena Spinsanti,<sup>2</sup> Luis Adrián Díaz,<sup>2,3</sup> María Elisa Rivarola,<sup>2</sup> Juan Arbiza,<sup>1</sup> Marta Contigiani,<sup>2</sup> and Adriana Delfraro<sup>1</sup>**

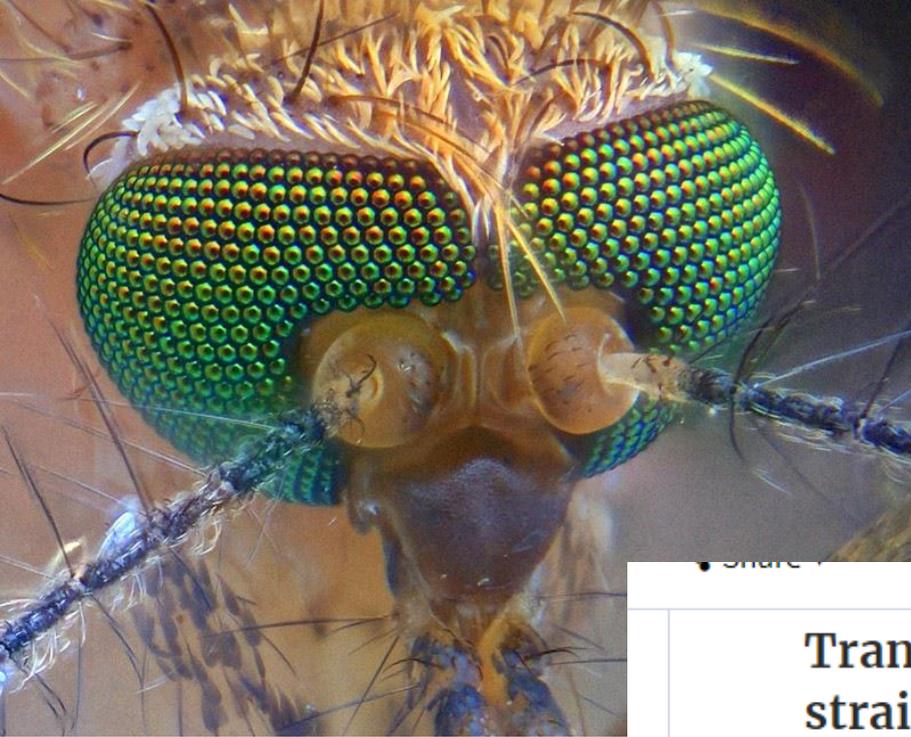
<sup>1</sup> *Sección Virología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, 11400 Montevideo, Uruguay*

<sup>2</sup> *Laboratorio de Arbovirus, Instituto de Virología Dr. J. M. Vanella, Universidad Nacional de Córdoba, 5016 Córdoba, Argentina*

<sup>3</sup> *Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas CONICET-PCFPyN, UNC, 5016 Córdoba, Argentina*

Correspondence should be addressed to Adriana Delfraro; [adelfraro@gmail.com](mailto:adelfraro@gmail.com)

Received 30 April 2013; Accepted 1 October 2013



## Transmission of endemic St Louis encephalitis virus strains by local *Culex quinquefasciatus* populations in Córdoba, Argentina

Luis Adrián Díaz ✉, Fernando Sebastián Flores, Mauricio Beranek, Maria Elisa Rivarola, Walter Ricardo Almirón, Marta Silvia Contigiani

*Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Volume 107, Issue 5, 1 May 2013, Pages 332–334, <https://doi.org/10.1093/trstmh/trt023>

**Published:** 08 March 2013    **Article history** ▼

**Received:** 20 September 2012

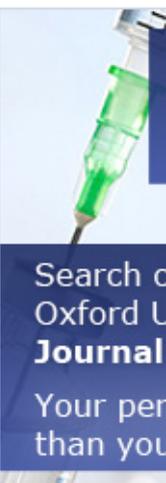
**Revision Received:** 21 January 2013

**Accepted:** 23 January 2013

### Abstract

#### Background

St Louis encephalitis virus (SLEV) is a re-emerging human pathogen widely distributed in the American continent. Although it is not fully understood, the SLEV transmission network may involve *Culex quinquefasciatus* mosquitoes as vectors and Columbidae species as hosts.



## Agradecimientos:

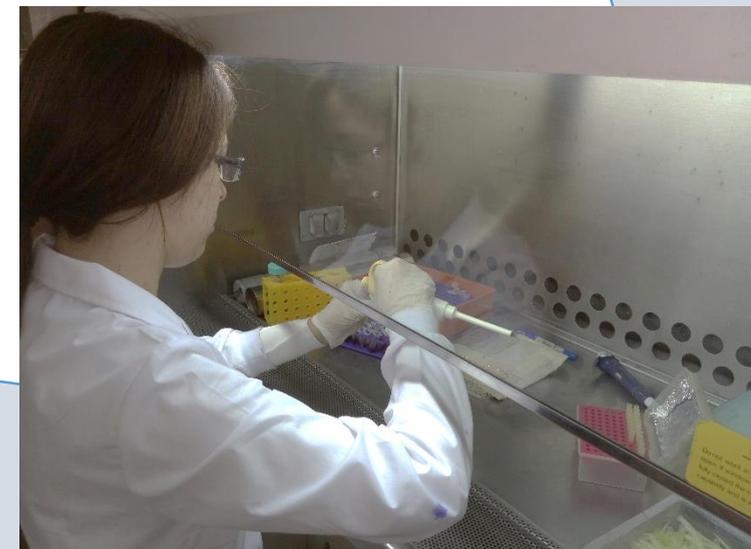
Lorena Spinsanti – UNC

Marta Contigiani – UNC

Fátima Cardozo – IICS, UNA

Laura Mendoza – IICS, UNA

Alejandra Rojas – IICS, UNA



# **ANEXOS**

## Preparación del stock viral



Cultivo celular infectado



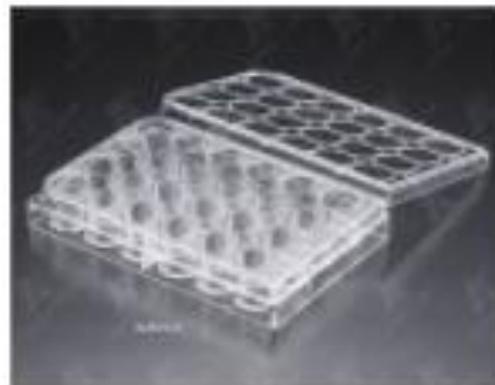
Suspensión de cerebro al 10% (p/v)  
en MEM con 10% de SFB

---

## Preparación de la monocapa celular



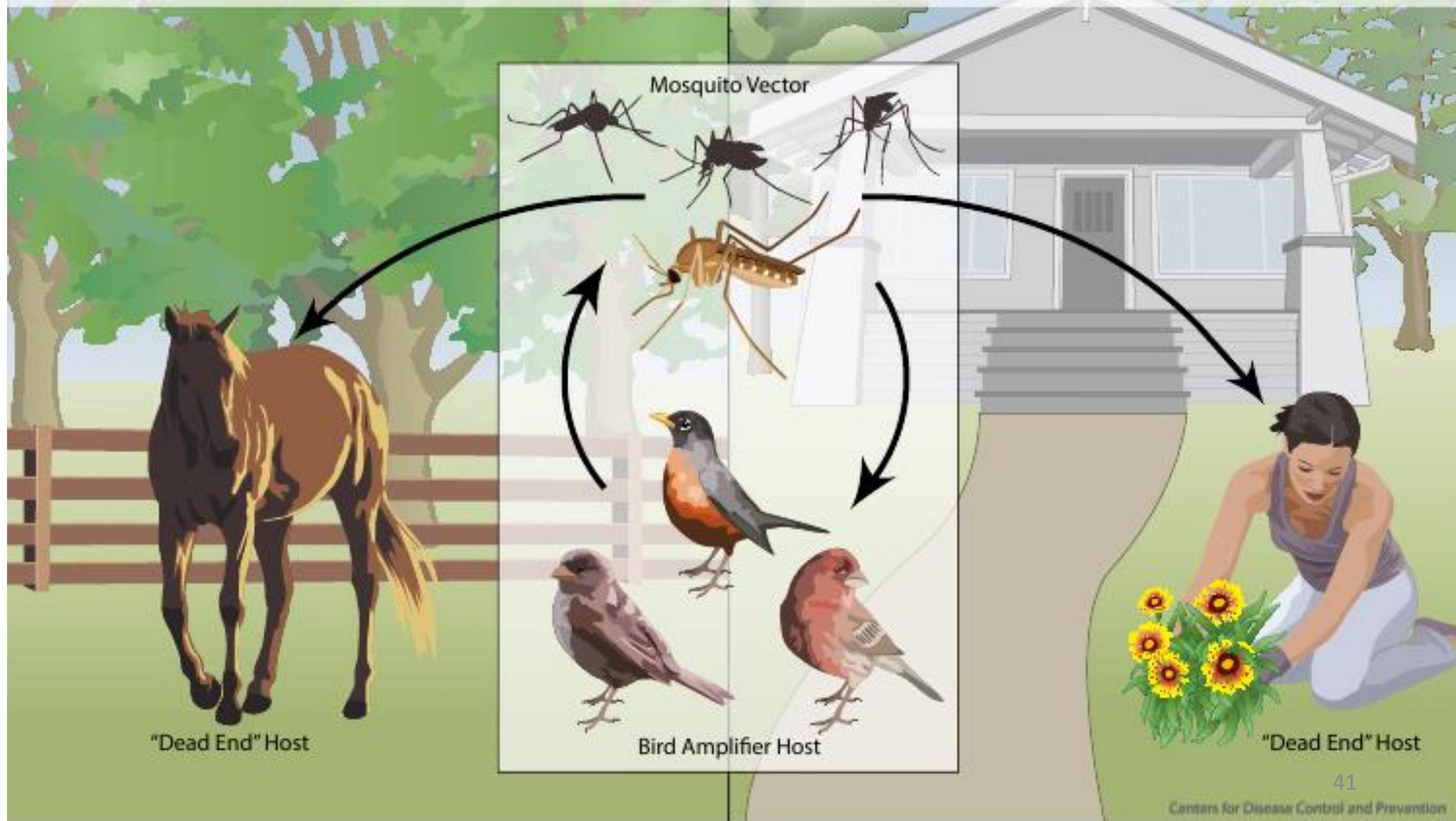
Elección de la placa de acuerdo al tamaño de las UFP



# West Nile Virus Transmission Cycle

In nature, West Nile virus cycles between mosquitoes (especially *Culex* species) and birds. Some infected birds, can develop high levels of the virus in their bloodstream and mosquitoes can become infected by biting these infected birds. After about a week, infected mosquitoes can pass the virus to more birds when they bite.

Mosquitoes with West Nile virus also bite and infect people, horses and other mammals. However, humans, horses and other mammals are 'dead end' hosts. This means that they do not develop high levels of virus in their bloodstream, and cannot pass the virus on to other biting mosquitoes.



# Transmission cycle of SLEV

