



Programa de Vinculación de Científicos y Tecnólogos CONACYT

B.C. Alejandra Rojas Segovia, MSc

Dpto. Producción. IICS-UNA

Instituto de Investigaciones en
Ciencias de la Salud
IICS-UNA



EMORY
UNIVERSITY
SCHOOL OF
MEDICINE

Division of
Infectious Diseases



5 al 22 diciembre 2016



*Desarrollo y aplicación de una rRT-PCR
para la detección simultánea de los virus
del dengue, chikungunya y Zika*

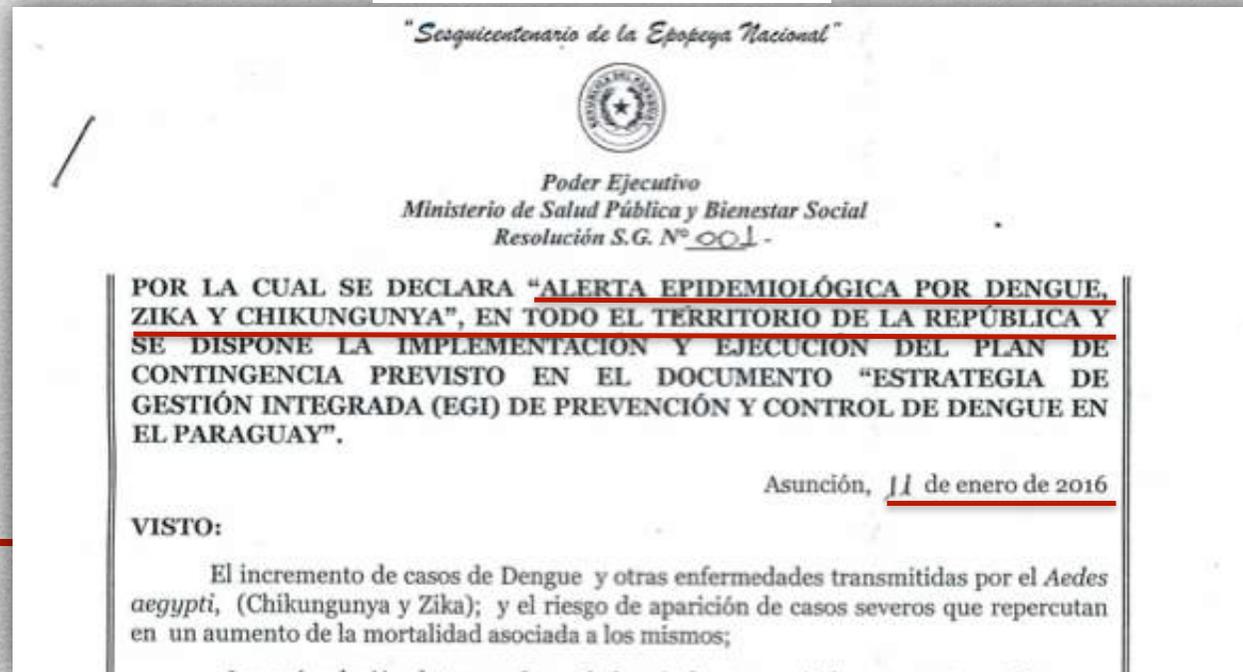
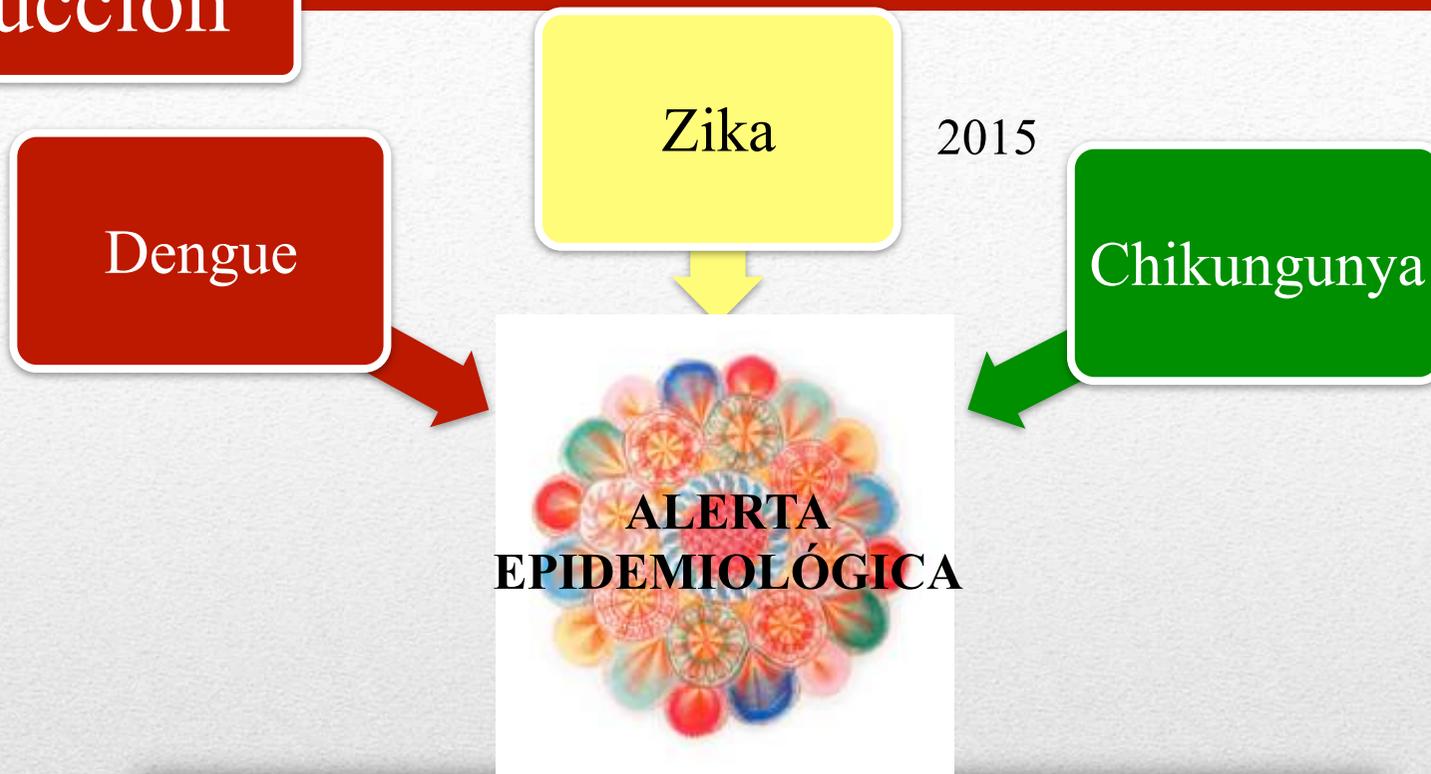
- Introducción
- Objetivos
- Materiales y métodos
- Resultados
- Conclusiones
- Perspectivas

Esquema



Introducción

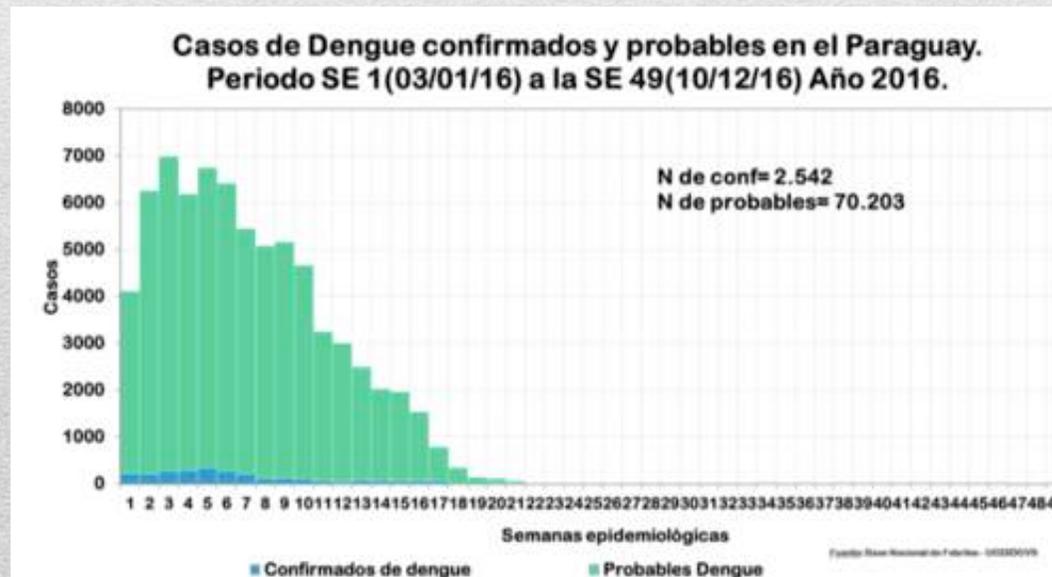
Introducción



DENV y CHIKV

- SE 1 (3/01) hasta SE 49 (10/12)

Confirmados		Probables DENV	Probables CHIKV	Sospechosos	Descartados	Fallecidos dengue
DENV	CHIKV					
2.542	38	70.203	880	99.886	8.070	16



ZIKV

- 2015: 6 casos confirmados
- 2016: 1.458 casos “notificados”
 - 8 confirmados (autóctonos)
 - 555 continúan sospechosos

(SE 1 a la SE 49)



- **Síndrome de Guillain Barré**
77 casos de sospechosos de estar asociados al virus del Zika

(SE 1 a la SE 49)

- **Síndrome congénito asociado**
 - 70 casos sospechosos
 - 2 casos confirmados por lab
 - 57 casos continúan en estudio



Disminuir
costos

Mejorar
detección

Agilizar pruebas

?

manifestaciones
clínicas
similares

Estudiar co-
infecciones



Justificación



Mejorar
detección

Disminuir
costos

Agilizar pruebas

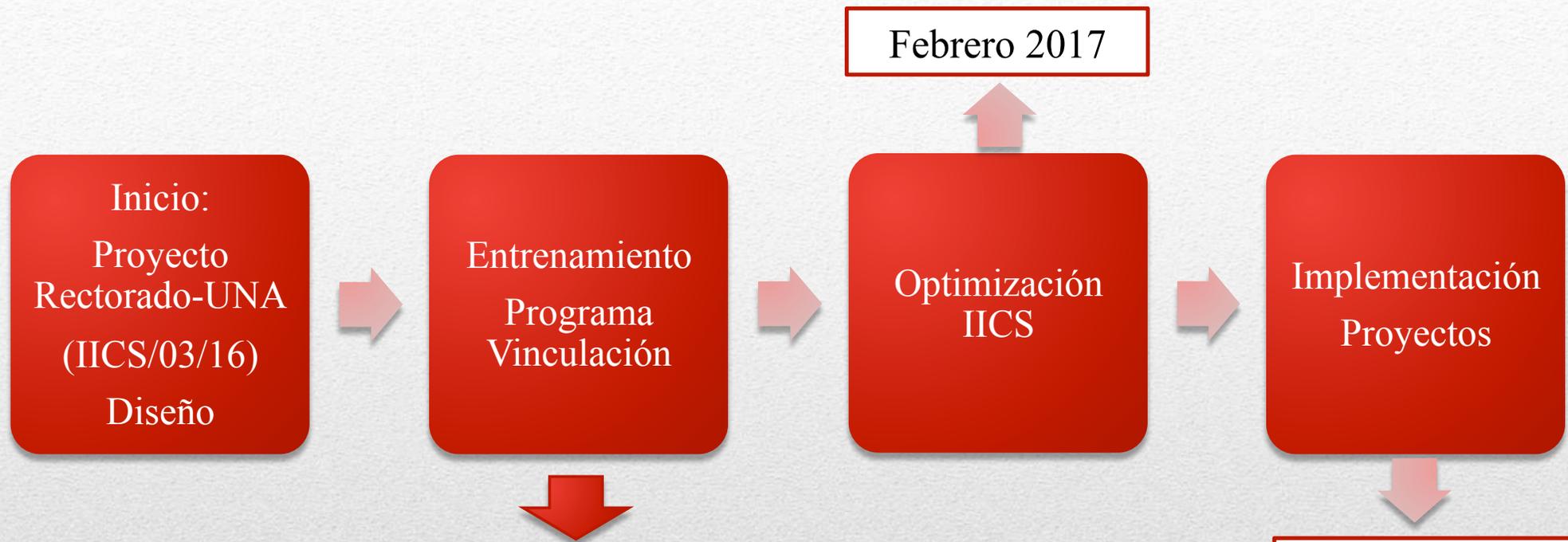
rRT-PCR
multiplex

manifestaciones
clínicas
similares

Estudiar co-
infecciones



Justificación



Single-Reaction Multiplex Reverse Transcription PCR for Detection of Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses

Jesse J. Waggoner, Lionel Gresh,
Alisha Mohamed-Hadley, Gabriela Ballesteros,
Maria Jose Vargas Davila, Yolanda Tellez,
Malaya K. Sahoo, Angel Balmaseda,
Eva Harris, Benjamin A. Pinsky

Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • Vol. 22, No. 7, July 2016

Corto-mediano-
largo plazo

Ampliar estudios
Proyectos
colaborativos



Objetivos

Objetivos

- *Adquirir capacidades para **diseño y desarrollo** de rRT-PCR tipo multiplex*
 - *Adquirir conocimientos para la **aplicación e interpretación** de resultados de rRT-PCR multiplex para DENV, CHIKV y ZIKV (optimización)*
 - ***Transferir** los conocimientos adquiridos e **implementar** la reacción (IICS)*
-



Materiales y métodos

- Bioinformática



OligoAnalyzer 3.1

[Instructions](#) | [Definitions](#) | [Feedback](#)

- Extracción ácidos nucleicos



- Primers y Sondas



- Kits One Step



- Controles

- Muestras

- Equipo





Resultados/Discusión

1. Diseño de primers / sondas
2. Aplicación de ZCD en muestras clínicas
3. Pruebas de nuevos primers y Sondas (BHQ+)
4. Multiplex vs Monoplex
5. Optimización de recursos
 - a) Kit OneStep: *Invitrogen* y *BioRad*
 - b) Volumen de reacción
6. rRT-PCR para detección, tipificación de DENV

Además:

- Desarrollo de rRT-PCR para VEEV
- Triplex: VEEV, MAYV y YFV

Principales actividades

Fluoróforos

Quasar 705

Cal Fluor
Red 610

FAM

Technical Appendix Table 1.

Primers and probe

Zika virus

Forward

Reverse 1

Reverse 2

Probe§

CHIKV

Forward

Reverse

Probe§



DENV

-1, -2, -3 Forward

-2 Forward C→T

-3 Forward C→T

-4 Forward

-1, 3 Reverse

-2 Reverse

-2 Reverse A→G

-4 Reverse

Probe A

Probe B

Probe C

Probe D

Ciclado

1 ciclo	52°C	15:00
1 ciclo	94°C	2:00
	94°C	0:15
45 ciclos	55°C*	0:40
	68°C	0:20

*Lectura

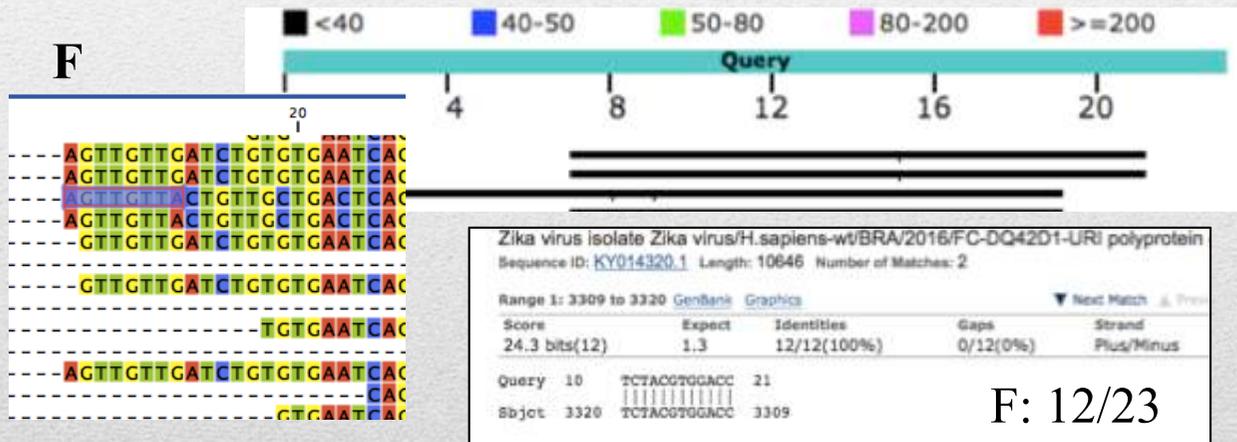
Ensayo ZCD

1. Diseño de primers / sondas

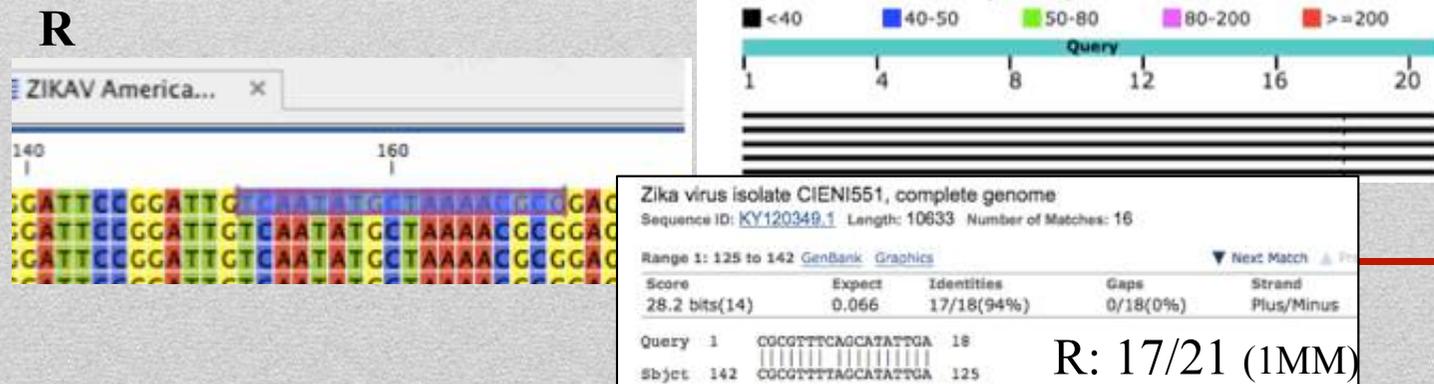
- Evaluación de *primers*

DENV: 5'UTR. Aquino y col. 2006 →

Análisis reacción cruzada ZIKV



- No interfieren target ZIKV
- Reverse ☹️



• Diseño de sondas

Sonda para primers 5'UTR

1. Búsqueda de secuencias conservadas

Alineamiento región interés

DENV-1: 712
DENV-2: 868
DENV-3: 420
DENV-4: 128



Opción:
Sonda a (DENV-1-3)
Sonda b (DENV-4)

Mejor: 1 Sonda (DENV-1-4) región de *Reverse*

2. Análisis contra virus misma flía.

Zika virus isolate 1_0015_PF polyprotein gene
Sequence ID: [KX447511.1](#) Length: 10585 Number of 1

Range 1: 2954 to 2963 GenBank Graphics

Score	Expect	Identities
20.3 bits(10)	14	10/10(100%)

Query 11 CTCTGATGAA 20
Sbjct 2963 CTCTGATGAA 2954

Range 2: 3317 to 3324 GenBank Graphics

Score	Expect	Identities
16.4 bits(8)	222	8/8(100%)

Query 9 ATCTCTGA 16
Sbjct 3317 ATCTCTGA 3324

No se observa alineamiento completo con ZIKV

3. Análisis de dímeros de primers

PriDimerCheck

Checking the possible primer dimers for multiplex PCR.

Paste source primer sequences below (5'->3'). FASTA fo

```
>sonda  
GAGAGCAGATCTCTGATGAA  
>primer F  
AGTTGTTAGTCTACGTGGACCGA  
>primer R  
CGCGTTTCAGCATATTGAAAG
```

Probabilidad baja

4. Análisis de T_m , hairpins, primers

OligoAnalyzer 3.1

Instructions | Definitions | Feedback

Sequence

```
5'- AGT TGT TAG TCT ACG TGG ACC GA
```

Primer3web version 4.0.0

T_m ligeramente baja

• Diseño de sondas

Sonda para primers 5'UTR

1. Búsqueda de secuencias conservadas

Alineamiento región interés

DENV-1: 712
DENV-2: 868
DENV-3: 420
DENV-4: 128



Opción:
Sonda a (DENV-1-3)
Sonda b (DENV-4)

Mejor: 1 Sonda (DENV-1-4) región de *Reverse*

2. Análisis contra virus misma flía.

Zika virus isolate 1_0015_PF polyprotein gene
Sequence ID: [KX447511.1](#) Length: 10585 Number of ...

Range 1: 2954 to 2963 [GenBank](#) [Graphics](#)

Score	Expect	Identities
20.3 bits(10)	14	10/10(100%)

Query 11 CTCTGATGAA 20
Sbjct 2963 CTCTGATGAA 2954

Range 2: 3317 to 3324 [GenBank](#) [Graphics](#)

Score	Expect	Identities
16.4 bits(8)	222	8/8(100%)

Query 9 ATCTCTGA 16
Sbjct 3317 ATCTCTGA 3324

No se observa alineamiento completo con ZIKV

3. Análisis de dímeros de primers

PriDimerCheck

Checking the possible primer dimers for multiplex PCR.

Paste source primer sequences below (5'->3'). FASTA fo

```
>sonda  
GAGAGCAGATCTCTGATGAA  
>primer F  
AGTTGTTAGTCTACGTGGACCGA  
>primer R  
CGCGTTTCAGCATATTGAAAG
```

Probabilidad baja

4. Análisis de T_m , hairpins, primers

OligoAnalyzer 3.1

Instructions | Definitions | Feedback

Sequence

```
5'- AGT TGT TAG TCT ACG TGG ACC GA
```

Primer3web version 4.0.0

T_m ligeramente baja

• Diseño de sondas

Sonda para primers 5'UTR

1. Búsqueda de secuencias conservadas

Alineamiento región interés

DENV-1: 712
DENV-2: 868
DENV-3: 420
DENV-4: 128



Opción:
Sonda a (DENV-1-3)
Sonda b (DENV-4)

Mejor: 1 Sonda (DENV-1-4) región de *Reverse*

2. Análisis contra virus misma flía.

Zika virus isolate 1_0015_PF polyprotein gene
Sequence ID: [KX447511.1](#) Length: 10585 Number of 1

Range 1: 2954 to 2963 GenBank Graphics

Score	Expect	Identities
20.3 bits(10)	14	10/10(100%)

Query	11	CTCTGATGAA	20
Sbjct	2963	CTCTGATGAA	2954

Range 2: 3317 to 3324 GenBank Graphics

Score	Expect	Identities
16.4 bits(8)	222	8/8(100%)

Query	9	ATCTCTGA	16
Sbjct	3317	ATCTCTGA	3324

No se observa alineamiento completo con ZIKV

3. Análisis de dímeros de primers

PriDimerCheck

Checking the possible primer dimers for multiplex PCR.

Paste source primer sequences below (5'->3'). FASTA fo

```
>sonda  
GAGAGCAGATCTCTGATGAA  
>primer F  
AGTTGTTAGTCTACGTGGACCGA  
>primer R  
CGCGTTTCAGCATATTGAAAG
```

Probabilidad baja

4. Análisis de T_m , hairpins, primers

OligoAnalyzer 3.1

Instructions | Definitions | Feedback

Sequence

5'- AGT TGT TAG TCT ACG TGG ACC GA

Primer3web version 4.0.0

T_m ligeramente baja

• Diseño de sondas

Sonda para primers 5'UTR

1. Búsqueda de secuencias conservadas

Alineamiento región interés

DENV-1: 712
DENV-2: 868
DENV-3: 420
DENV-4: 128



Opción:
Sonda a (DENV-1-3)
Sonda b (DENV-4)

Mejor: 1 Sonda (DENV-1-4) región de *Reverse*

2. Análisis contra virus misma flía.

Zika virus isolate 1_0015_PF polyprotein gene
Sequence ID: [KX447511.1](#) Length: 10585 Number of 1

Range 1: 2954 to 2963 GenBank [Graphics](#)

Score	Expect	Identities
20.3 bits(10)	14	10/10(100%)

Query 11 CTCTGATGAA 20
Sbjct 2963 CTCTGATGAA 2954

Range 2: 3317 to 3324 GenBank [Graphics](#)

Score	Expect	Identities
16.4 bits(8)	222	8/8(100%)

Query 9 ATCTCTGA 16
Sbjct 3317 ATCTCTGA 3324

No se observa alineamiento completo con ZIKV

3. Análisis de dímeros de primers

PriDimerCheck

Checking the possible primer dimers for multiplex PCR.

Paste source primer sequences below (5'→3'). FASTA fo

```
>sonda  
GAGAGCAGATCTCTGATGAA  
>primer F  
AGTTGTTAGTCTACGTGGACCGA  
>primer R  
CGCGTTTCAGCATATTGAAAG
```

Probabilidad baja

4. Análisis de T_m , hairpins, primers

OligoAnalyzer 3.1

[Instructions](#) | [Definitions](#) | [Feedback](#)

Sequence

```
5'- AGT TGT TAG TCT ACG TGG ACC GA
```

Primer3web version 4.0.0

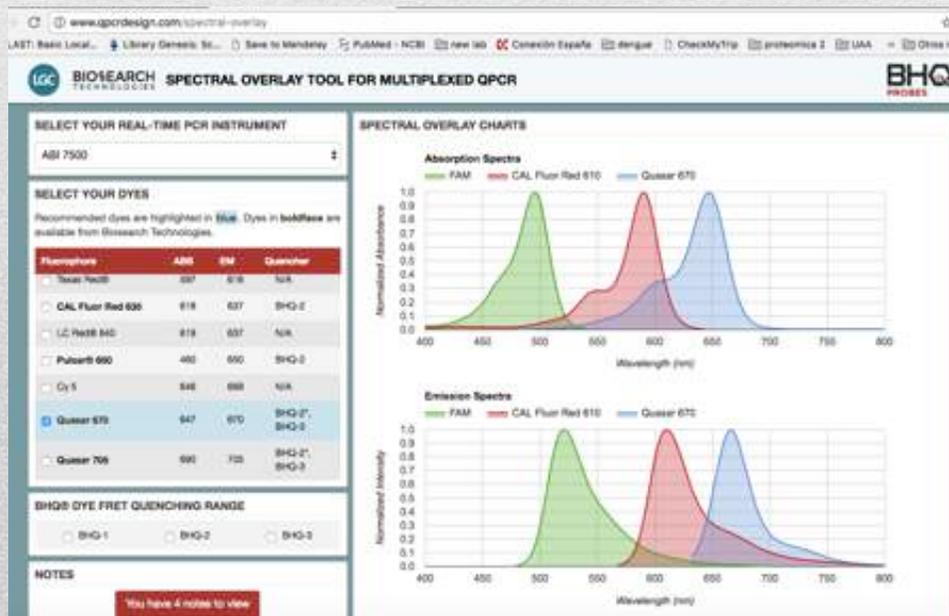
T_m ligeramente baja

5. Elección de fluoróforos

- Equipo
- Target
- Número de targets
- Control interno

- Combinaciones recomendadas por el fabricante

Abi 7500 o CFX96:
FAM, Cal Fluor Red 610 y Quasar 670



- Otra alternativa:
FAM, Texas Red y Cy5
- Si se necesitara 4to:
HEX o JOE

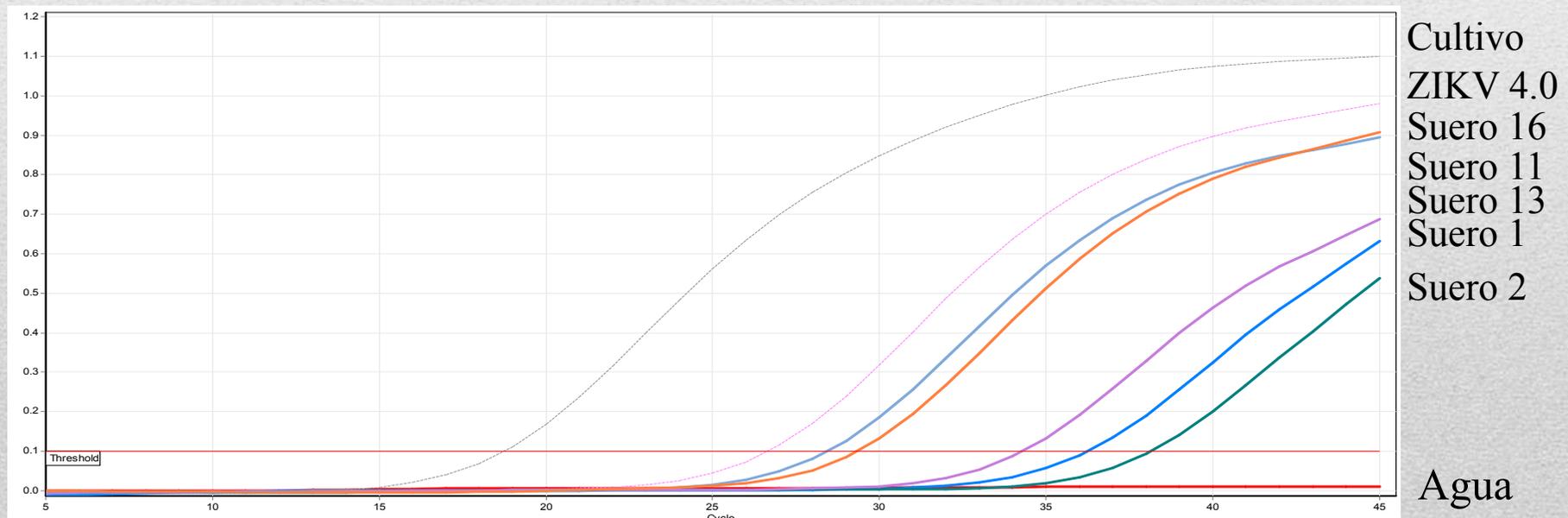
2. Aplicación de ZCD en muestras clínicas

Detección de ZIKV

Muestra	Ct
ZIKV 4.0	26.7
Suero 1	36.3
Suero 2	38.2
Suero 11	28.5
Suero 13	34.3
Suero 16	29.4
Cultivo	18.8

Otras:

- Placenta
- Semen



3. Pruebas de nuevos primers y sondas

ZIKV

✓ Mejorar sensibilidad con nuevos *primers/sondas*

Ensayo	<i>Multiplex</i>	<i>monoplex</i>				
<i>primers</i>	ZCD	ZCD	ZCD	nuevos	nuevos	nuevos
sondas	ZCD	ZCD	larga	larga	larga RC	BHQ+ [®]
Conc. nM	300/100	300/200				

Controles

ZIKV 10⁶copias/μL

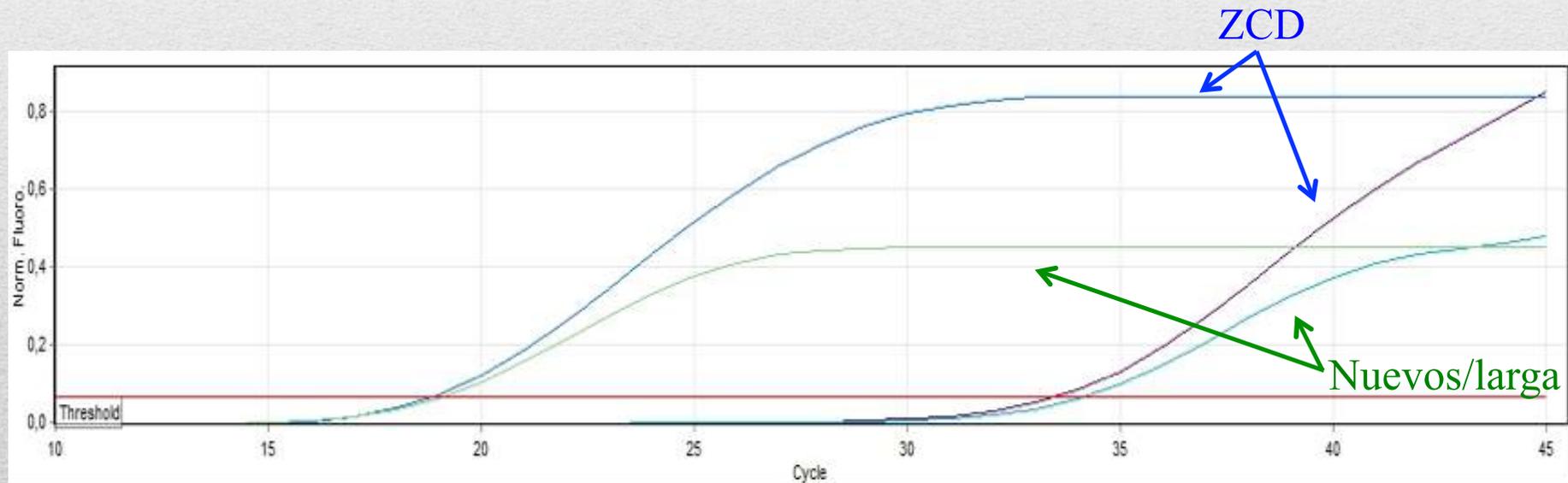
ZIKV 10²copias/μL

3. Pruebas de nuevos primers y sondas

ZIKV

✓ Mejorar sensibilidad con nuevos *primers/sondas*

Ensayo	Multiplex	monoplex				
primers	ZCD	ZCD	ZCD	nuevos	nuevos	nuevos
sondas	ZCD	ZCD	larga	larga	larga RC	BHQ+®



Controles

ZIKV 10⁶copias/μL

ZIKV 10²copias/μL

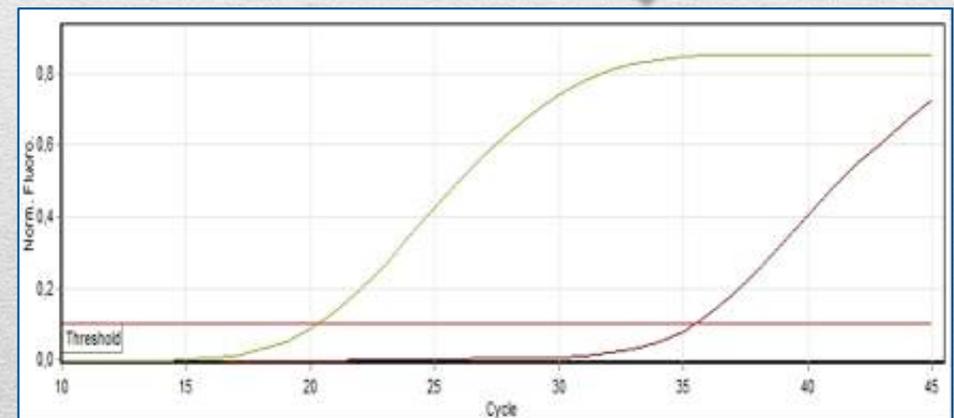
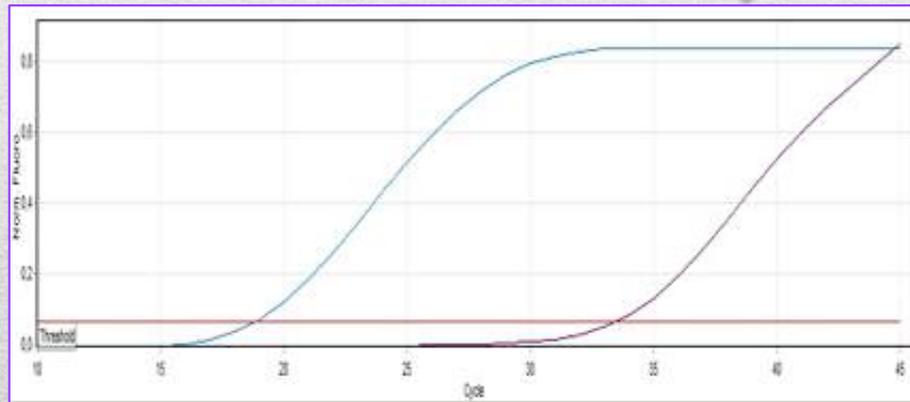
- 1) Primers/sonda ZCD: bien o mejor
- 2) Nuevos *primers* } no mejoran
- 3) Sonda larga } no mejoran

3. Pruebas de nuevos primers y sondas

ZIKV

✓ Mejorar sensibilidad con nuevos *primers/sondas*

Ensayo	<i>Multiplex</i>	<i>monoplex</i>				
<i>primers</i>	ZCD	ZCD	ZCD	nuevos	nuevos	nuevos
sondas	ZCD	ZCD	larga	larga	larga RC	BHQ+®



Controles
ZIKV

Primers/sonda
ZCD

Nuevos/
BHQ+®

10⁶copias/μL

33,5

35,5

10²copias/μL

18,8

20,4

BHQ+® buena señal pero Ct lig. más tardíos

✓ Evaluar primers ZCD con sonda: BHQ+®

ZIKV

✓ Evaluar mejora de sensibilidad con nueva sonda BHQ+[®] y primers ZCD

a) monoplex

1. Primers ZCD/sonda ZCD
2. Primers ZCD/sonda BHQ+[®]

Controles

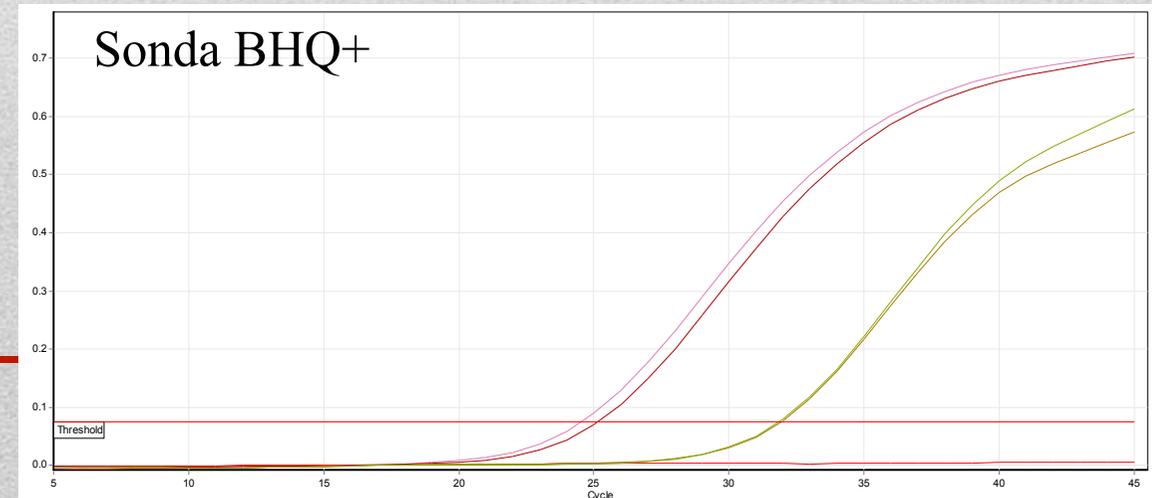
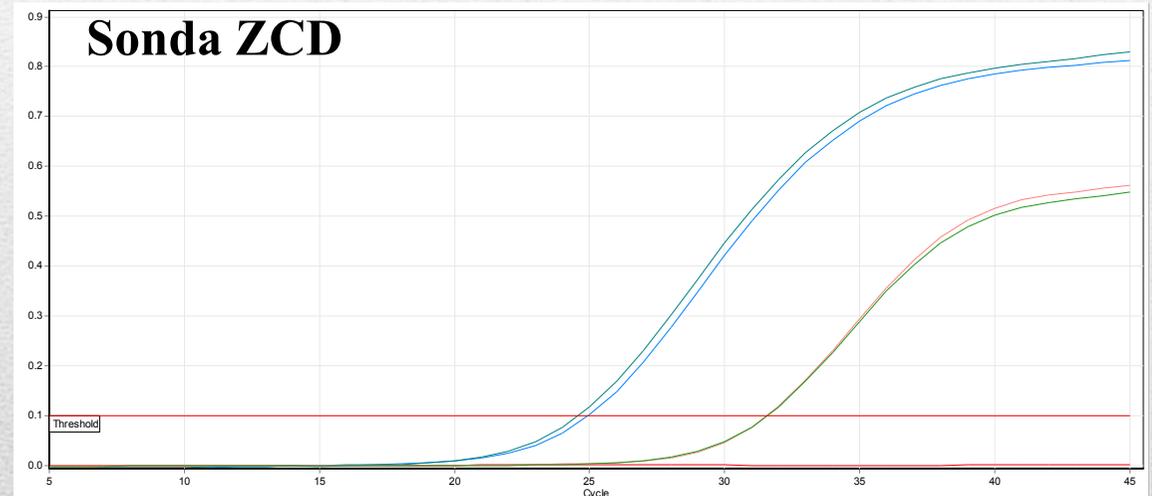
ZIKV 10²c/μL

ZIKV 10⁴ c/μL

b) Multiplex

- Valores de Ct similares
- Curvas similares...
- Sonda ZCD: ↓costo
- Mayor disponibilidad
- Más proveedores (además de *Biosearch Technologies*)

✓ Se mantiene la *sonda ZCD*

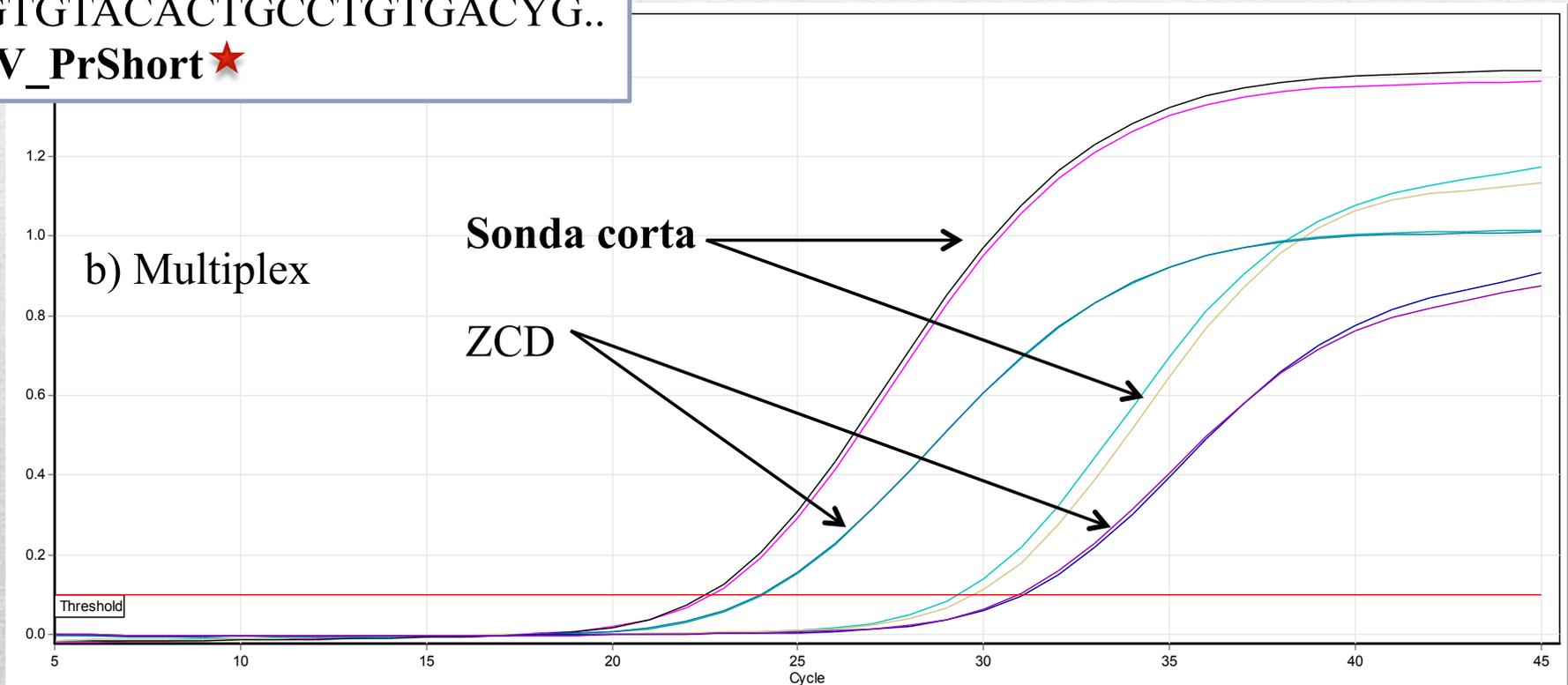


CHIKV

✓ Nueva sonda para evitar Rx.Cz. con virus *O'nyon N'yon*

Chik_D_Probe2
GCGGTGTACTACTGCCTGTGACYGC
.....GTGTACTACTGCCTGTGACYG..
CHIKV_PrShort ★

a) Monoplex
Primer ZCD/sonda ZCD
Primer ZCD/Sonda corta



Controles

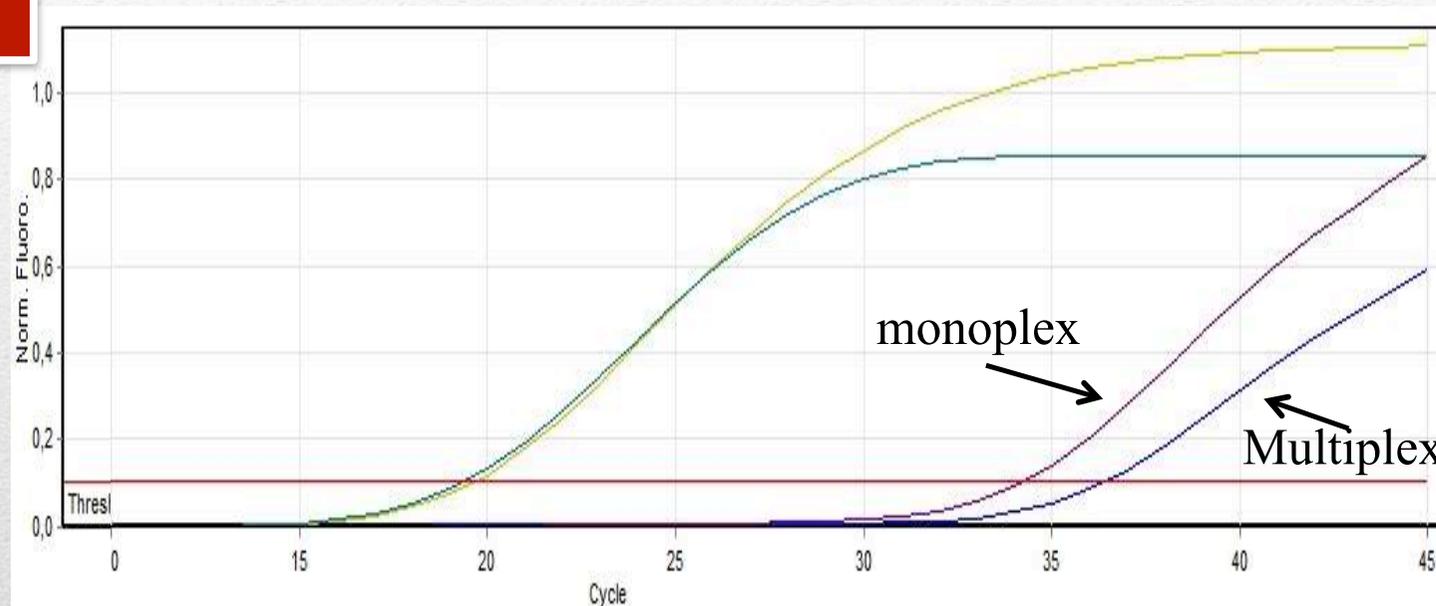
CHIKV 10^2 c/ μ L

CHIKV 10^6 c/ μ L

✓ Mejor respuesta (↑sensibilidad)
con *sonda corta*

4. Multiplex vs. monoplex

ZIKV



<i>Control</i>	<i>Ct ZCD Multiplex</i>	<i>Ct monoplex</i>
ZIKV 10 ⁶ copias/μL	20,1	19,8
ZIKV 10 ² copias/μL	36,6	34,5

- Resultados similares M vs. m
- *monoplex* un poco mejor (10²)
- *Multiplex* puede ↓ sensibilidad (“*quenching*”)
- Hay excepciones !

5. Optimización de recursos

- a) Kit *OneStep*: *Invitrogen* y *BioRad*
- b) Volumen de reacción

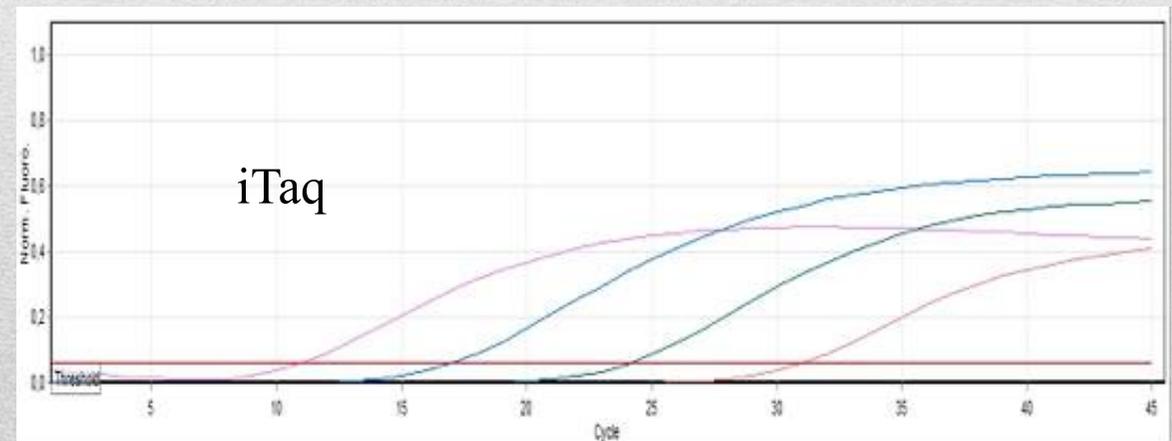
a) Kit *OneStep*:

Comparar 2 kits: SSIII (*Invitrogen*) y iTaq (*BioRad*) (2X)



Control	Ct SSIII (<i>Invitrogen</i>)	Ct iTaq (<i>BioRad</i>)
DENV 10 ⁸ c/μL	12.29	12.13
CHIKV 10 ⁸ c/μL	9.51	10.56
ZIKV 10 ⁸ c/μL	10.24	10.57
ZIKV 10 ⁶ c/μL	17.02	17.52
ZIKV 10 ⁴ c/μL	23.80	24.19
ZIKV 10 ² c/μL	30.72	31.19

Kit 100 rx	<i>Invitrogen</i>	<i>BioRad</i>
Py (US\$)	750	362



- ✓ Señal de fluorescencia menor para iTaq
- ✓ Pero.. Sólo pequeñas diferencias en Ct 😊

5. Optimización de recursos

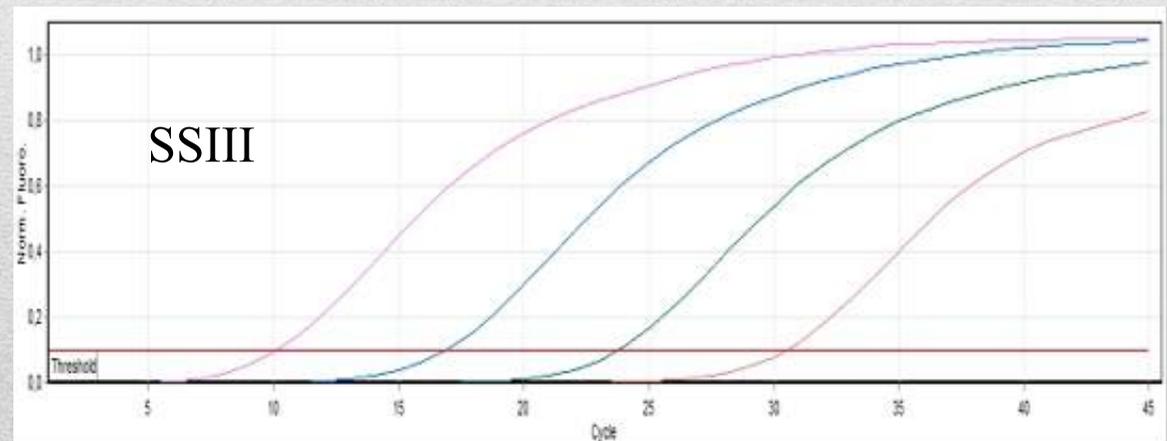
- a) Kit *OneStep*: *Invitrogen* y *BioRad*
- b) Volumen de reacción

a) Kit **OneStep**:

Comparar 2 kits: SSIII (*Invitrogen*) y iTaq (*BioRad*) (2X)



Control	Ct SSIII (<i>Invitrogen</i>)	Ct iTaq (<i>BioRad</i>)
DENV 10 ⁸ c/μL	12.29	12.13
CHIKV 10 ⁸ c/μL	9.51	10.56
ZIKV 10 ⁸ c/μL	10.24	10.57
ZIKV 10 ⁶ c/μL	17.02	17.52
ZIKV 10 ⁴ c/μL	23.80	24.19
ZIKV 10 ² c/μL	30.72	31.19



- ✓ Señal de fluorescencia menor para iTaq
- ✓ Pero.. Sólo pequeñas diferencias en Ct 😊

5. Optimización de recursos

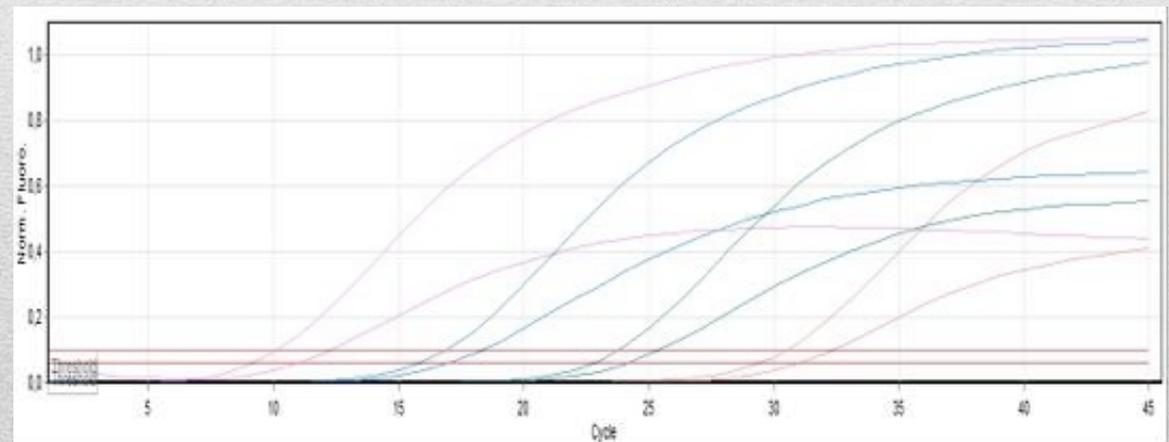
- a) Kit *OneStep*: *Invitrogen* y *BioRad*
- b) Volumen de reacción

a) Kit *OneStep*:

Comparar 2 kits: *SSIII (Invitrogen)* y *iTaq (BioRad)* (2X)



Control	<i>Ct SSIII (Invitrogen)</i>	<i>Ct iTaq (BioRad)</i>
DENV 10 ⁸ c/μL	12.29	12.13
CHIKV 10 ⁸ c/μL	9.51	10.56
ZIKV 10 ⁸ c/μL	10.24	10.57
ZIKV 10 ⁶ c/μL	17.02	17.52
ZIKV 10 ⁴ c/μL	23.80	24.19
ZIKV 10 ² c/μL	30.72	31.19



- ✓ Señal de fluorescencia menor para *iTaq*
- ✓ Pero.. Sólo pequeñas diferencias en *Ct* 😊

b) Volumen de reacción

Componentes	Volumen / μL
2x Mix buffer	6,25
Primers/sondas	1
Mix Enzimas	0,25
Subtotal	7,5
Template*	5
Total	12,5

1. Prueba de ZCD ¼ fórmula: 12,5 μL
SSIII (*Invitrogen*)



Vol (μL)
Kit: 50
JW: 25
Py: 12,5?

Control	Ct SSIII 25 μL	Ct SSIII 12,5 μL	Dif.
ZIKV 10 ⁶	17.02	16.16	0.86
ZIKV 10 ⁴	23.80	23.27	0.53
ZIKV 10 ²	30.72	30.03	0.69



- Ct similar, lig. más “temprano”
- Debido \uparrow Template*

Resultados similares con:

2. Prueba de ZCD 1/2 fórmula: 10 μL
iTaq (*BioRad*)

6. rRT-PCR para detección, tipificación de DENV

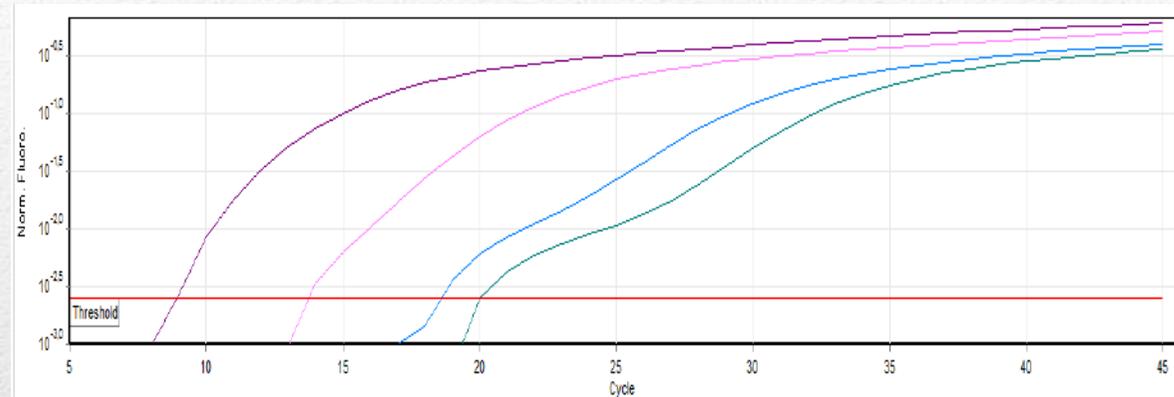
Controles:

DENV-1 al DENV-4

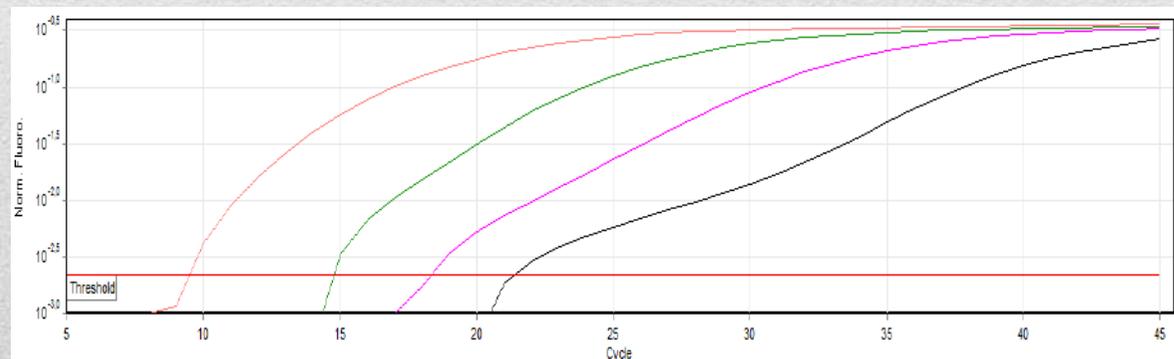
10^8 10^6 10^4 10^2 copias/ μ L

DENV Multiplex Primers	
Den1-2-3 F-long	
Den1 5' New Down	
Den2 F-long C to T	
Den2 R2	
Den2 R2 A to G	
Den3 F-long C to T	
Den4 F1	
Den4 R1	
DENV Multiplex Probes	5' Fluor
Den1 Alternate	FAM
Den2 Multiplex	Cal Fluor 560
Den3 March	Cal Fluor 610
Den4 March	Quasar 670

DENV-1



DENV-2



PLoS Negl Trop Dis. 2013 Apr; 7(4): e2116.

PMCID: PMC3630

Published online 2013 Apr 18. doi: [10.1371/journal.pntd.0002116](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002116)

Single-Reaction, Multiplex, Real-Time RT-PCR for the Detection, Quantitation, and Serotyping of Dengue Viruses

Jesse J. Waggoner,¹ Janaki Abeynayake,² Malaya K. Sahoo,² Lionel Gresh,³ Yolanda Tellez,⁴ Karla Gonzalez,⁴ Gabriela Ballesteros,⁴ Anna M. Pierro,⁵ Paolo Gaibani,⁵ Frances P. Guo,² Vittorio Sambri,⁵ Angel Balmaseda,⁴ Kumudu Karunaratne,⁶ Eva Harris,⁷ and Benjamin A. Pinsky^{1,2,*}



Conclusiones

Diseño final*

*Redesigned
MA assay*

DENV-1-2-3_DegFor	
DENV-4 Forward	
DENV-1-3 Reverse	
DENV-2 Reverse	
DENV-4 Reverse	
DENV PanProbe	Quasar 670
Zika F1	
Zika R1 TC	
Zika R1 CT	
ZIKV_Pr1	FAM
Chik D F2Y	
Chik D R2	
CHIKV_PrShort	Cal fluor Red 610

Diferencias con ZCD

- ↓ primers DENV
- ↓ sondas DENV
- Sonda corta CHIKV
- Diferentes Fluoróforos

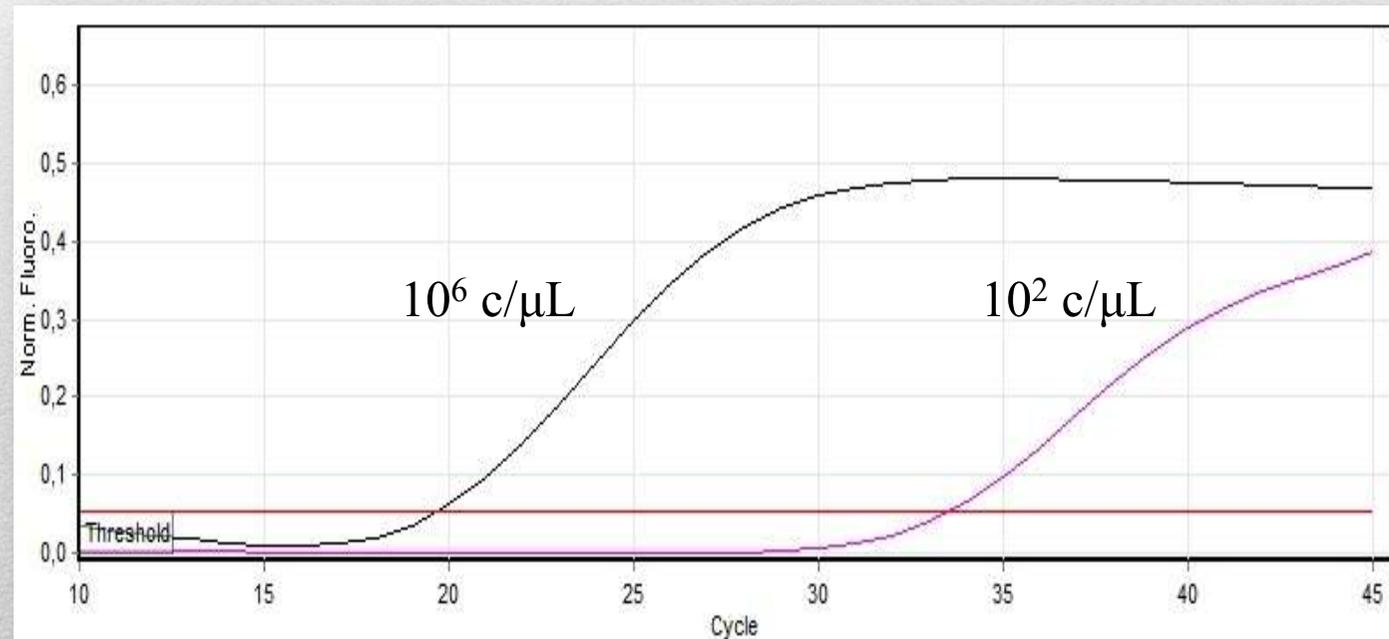


Pruebas adicionales...

rRT-PCR para VEEV

Prueba diferentes concentraciones de primers y sondas

- **Control VEEV:** Secuencia consenso (*IDT*)



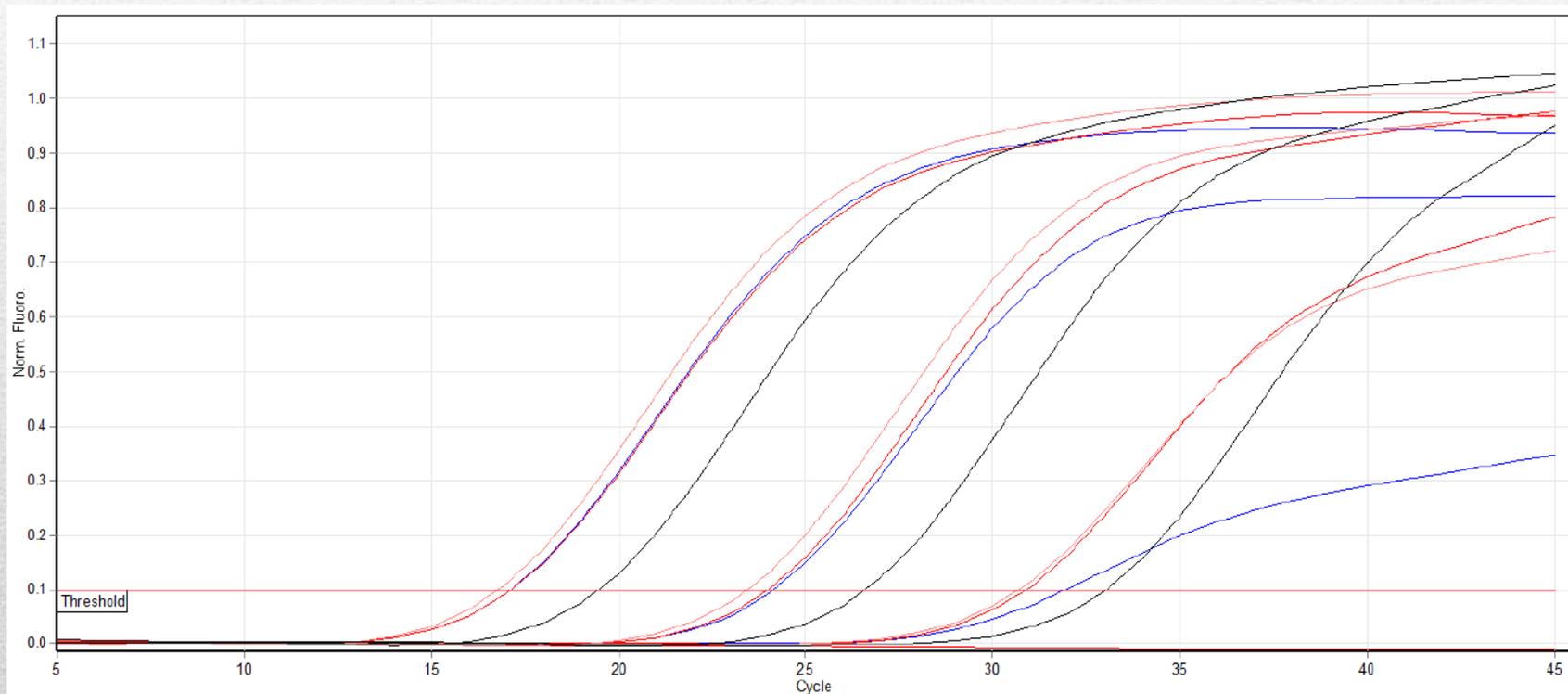
Re-diseño para mejorar:
 10^2 c/ μ L y Multiplex...

Mejor respuesta:
Primers 400 nM / sonda 200 nM

Triplex VEEV, MAYV, YFV

Prueba con MAYV

10^6 10^4 10^2 c/ μ L



Triplex: VEEV-MAYV-YFV

Duplexes: VEEV-MAYV y MAYV-YFV

Monoplex: MAYV

- ✓ Cambio de fluoróforo de MAYV
- ✓ Tal vez... Dejar en Duplex



Perspectivas

Emerging and Endemic Arboviruses in Acutely-Ill Patients, Asunción, Paraguay

Emory University – Pilot Project 2017-2018, International Collaboration Research Award

Jesse J. Waggoner
Assistant Professor
Division of Infectious Diseases
Department of Medicine
Emory University School of Medicine
Email: jesse.j.waggoner@emory.edu
Telephone: (404) 712-2360



Collaborators

Yvalena Arévalo de Guillén
Alejandra Rojas
Departamento de Producción
Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud
Universidad Nacional de Asunción
Asunción, Paraguay



Benjamin A. Pinsky
Departments of Pathology and Medicine
Division of Infectious Diseases and Geographic Medicine
Stanford University School of Medicine
Stanford, California



Otros proyectos en colaboración...

University Research Committee Application Certification Page

I understand and accept the terms and conditions as they apply to the regular URC grant application and the URC International Collaboration grant application as set forth in the University Research Committee grant regulations.

Jesse Waggoner
PRINT Applicant Name

[Signature]
Applicant Signature

1/5/17
Date

Department Chair Approval

[Signature]
Department Chair Signature

1/5/17
Date

Agradecimientos



Programa de Vinculación de científicos y tecnólogos

Instituto de Investigaciones en
Ciencias de la Salud
IICS-UNA



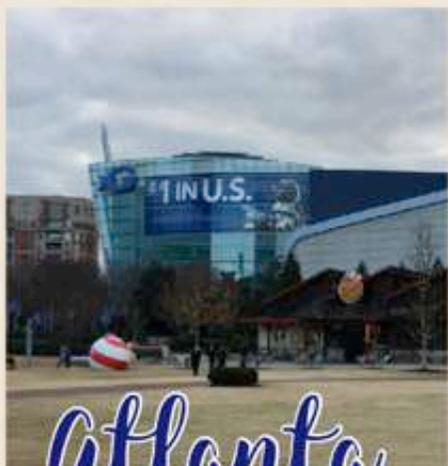
Dpto. Producción



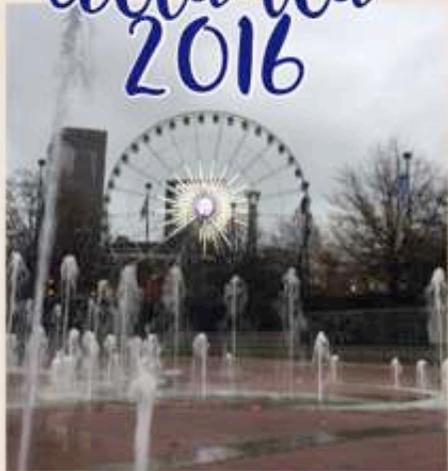
Jesse Waggoner, MD



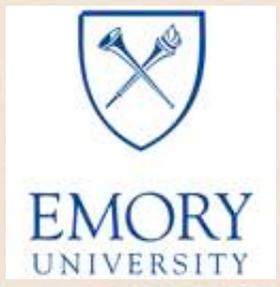
***Muchas gracias por la
atención!***



Atlanta
2016



PIC•COLLAGE



PIC•COLLAGE

Aim 1. Optimize and implement multiplex arboviral assays with reduced test costs in Asunción, Paraguay. “Triplex” real-time reverse transcription PCRs (rRT-PCRs) for 1) ZIKV, CHIKV, and DENV and 2) VEEV, MAYV, and YFV will be optimized to decrease test costs. Assays will be evaluated using archived clinical samples and compared to published rRT-PCRs. Optimized assays will be implemented in Asunción, Paraguay for this study and to improve local testing capacity.

Aim 2. Characterize arboviral infections among acutely ill patients. Patients who present with an acute systemic illness will be enrolled in a prospective study to characterize arboviral infections in Asunción. For each virus identified, we will study the detection rate over time; describe associated clinical manifestations and epidemiologic factors; and evaluate qualitative and quantitative antibody responses in relation to viral load at presentation.

Aim 3. Identify phylogenetic relationships and points of introduction for Paraguayan arboviral strains. Whole genomes of detected viral strains will be sequenced using culture-independent methods to evaluate associations between strains and clinical manifestations; determine phylogenetic relationships between strains; and estimate the number and route of introduction events for arboviruses.