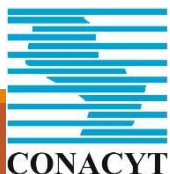


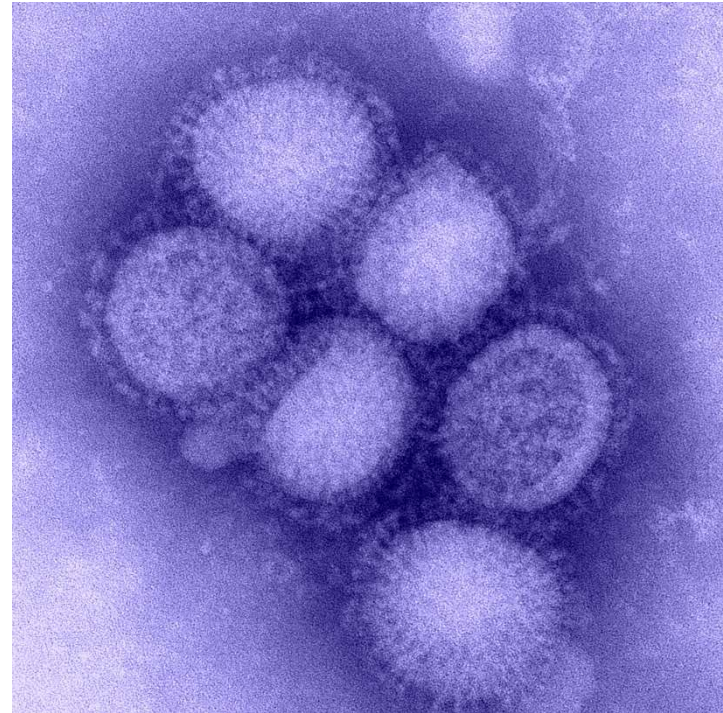
Identificación de virus respiratorios emergentes con potencial pandémico: Influenzavirus A(H7N9) y MERS-CoV

Lic. Edgar Cardozo
Estudiante de Maestría en Ciencias Biomédicas
Dpto. Biología Molecular y Biotecnología

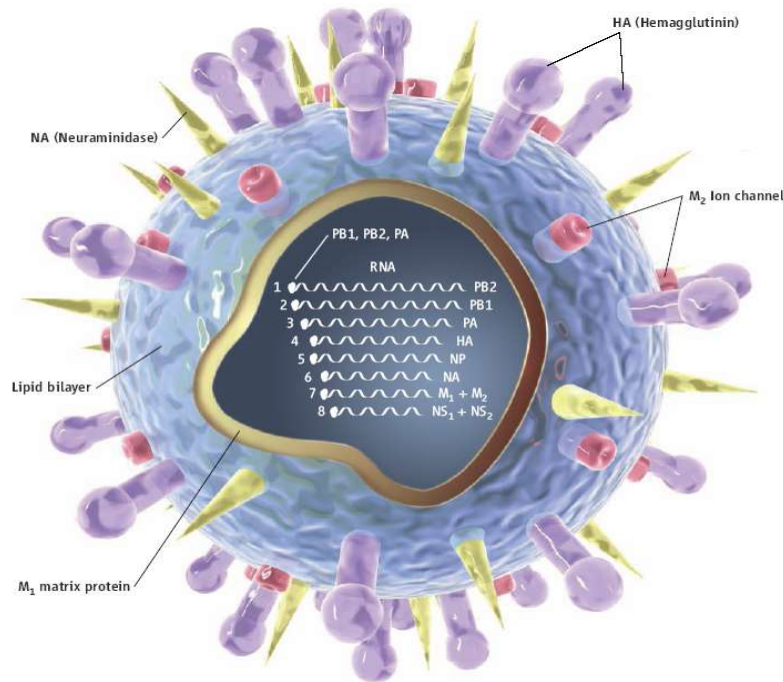
*Programa de Pasantía organizado por ViroRed-CYTED y el INEI-ANLIS (Arg)
Estancia de Vinculación Financiada por el CONACYT*



Virus Influenza A (H7N9)



Generalidades del virus de Influenza

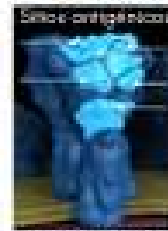
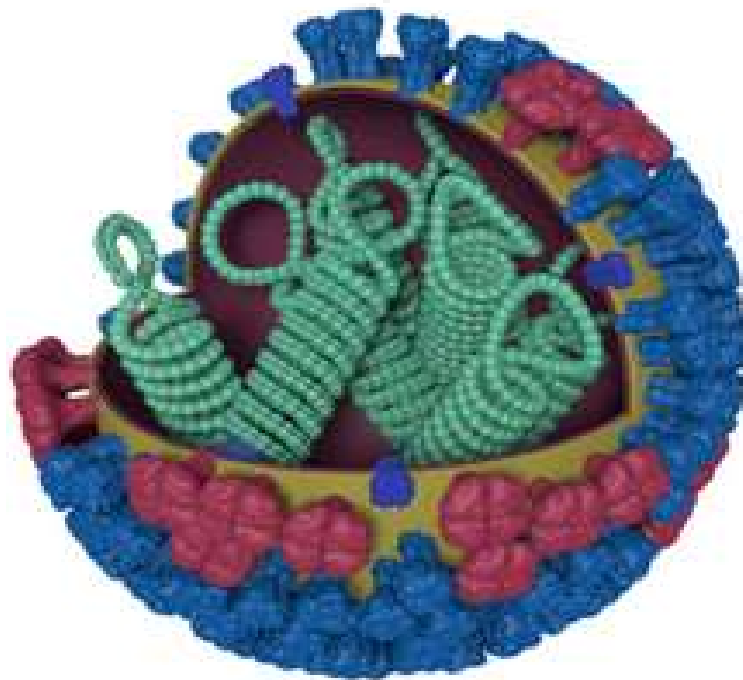


- Pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*.
- Se dividen en tres tipos llamados A, B y C.
- Los tipos A y B son los responsables de las epidemias que se producen casi todos los inviernos

- Los virus de influenza A se dividen en subtipos según dos proteínas de la superficie: la hemaglutinina (H) y la neuromidasa (N). Hay 18 subtipos diferentes de hemaglutinina y 11 subtipos diferentes de neuromidasa. (H1 hasta H18 y N1 hasta N11 respectivamente).

Tiene 8 segmentos de ARN de cadena simple y sentido negativo, los segmentos son de 890 a 2300 pb. El genoma esta compuesto de aproximadamente 13,500 pb y codifica 11 proteínas:

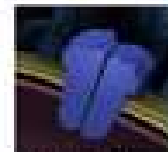
VIRUS DE LA INFLUENZA



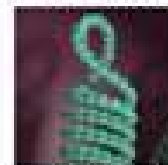
Hemaglutinina



Neuraminidasa



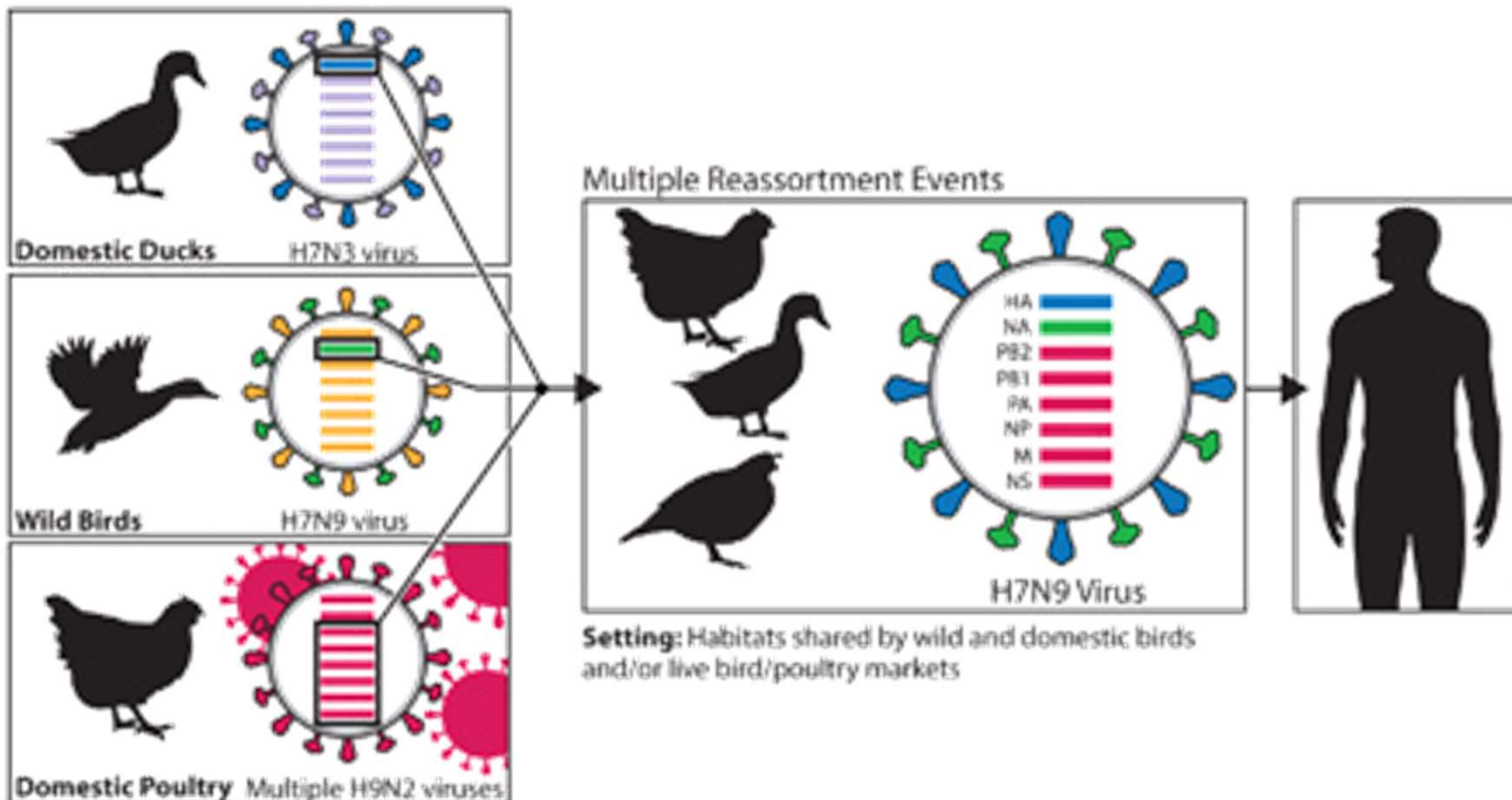
Nucleoproteína



Polimerasa

- Hemaglutinina (HA)
- Neuraminidasa (NA)
- Nucleoproteína (NP)
- Matriz (M1)
- M2
- NS1
- NS2
- Proteasa (PA)
- Polimerasa (PB1)
- PB1-F2
- PB2

Genetic Evolution of H7N9 Virus in China, 2013



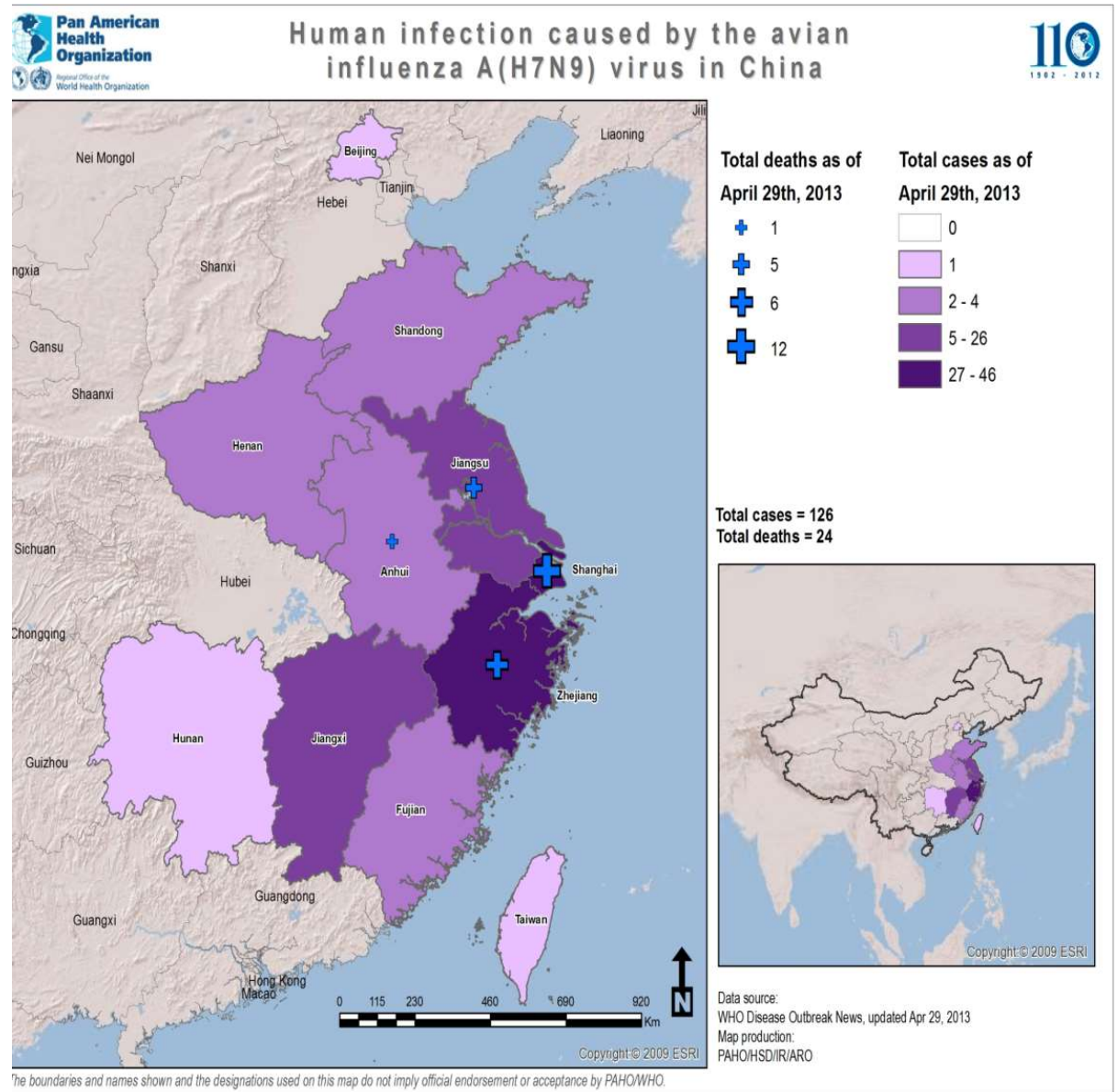
The eight genes of the H7N9 virus are closely related to avian influenza viruses found in domestic ducks, wild birds and domestic poultry in Asia. The virus likely emerged from "reassortment," a process in which two or more influenza viruses co-infect a single host and exchange genes. This can result in the creation of a new influenza virus. Experts think multiple reassortment events led to the creation of the H7N9 virus. These events may have occurred in habitats shared by wild and domestic birds and/or in live bird/poultry markets, where different species of birds are bought and sold for food. As the above diagram shows, the H7N9 virus likely obtained its HA (hemagglutinin) gene from domestic ducks, its NA (neuraminidase) gene from wild birds, and its six remaining genes from multiple related H9N2 influenza viruses in domestic poultry.



Centers for Disease
Control and Prevention
National Center for Immunization
and Respiratory Diseases

H7N9. Casos

- Para el año 2014, los casos confirmados tenían 22% de mortalidad.
- De todos los casos, 67% eran hombres.
- La media de edad de casos reportados es 58 años, y de los casos fatales 66 años.





The H7N9 virus

- Antivirals

- All viruses so far are resistant to M2 Inhibitors
- In general susceptible to NAIs
 - In the course of treatment with NAI, resistant mutations emerged in 3 patients
 - Oseltamivir (oral) is the most commonly available and used therapy, even in intensive care settings
 - Parenteral preparations of zanamavir and peramivir are in clinical trials
 - Parenteral peramivir is SFDA China approved but production and use remain limited
- Novel antivirals therapies in development



H7N9 vs. H5N1

● H7N9

- In < 6 months, 135 cases, CFR 33%
- Low pathogenicity avian influenza virus
- Genetic analysis indicates greater ability to infect mammals, including humans, than other avian influenza viruses.
- 100 cases: 2 months

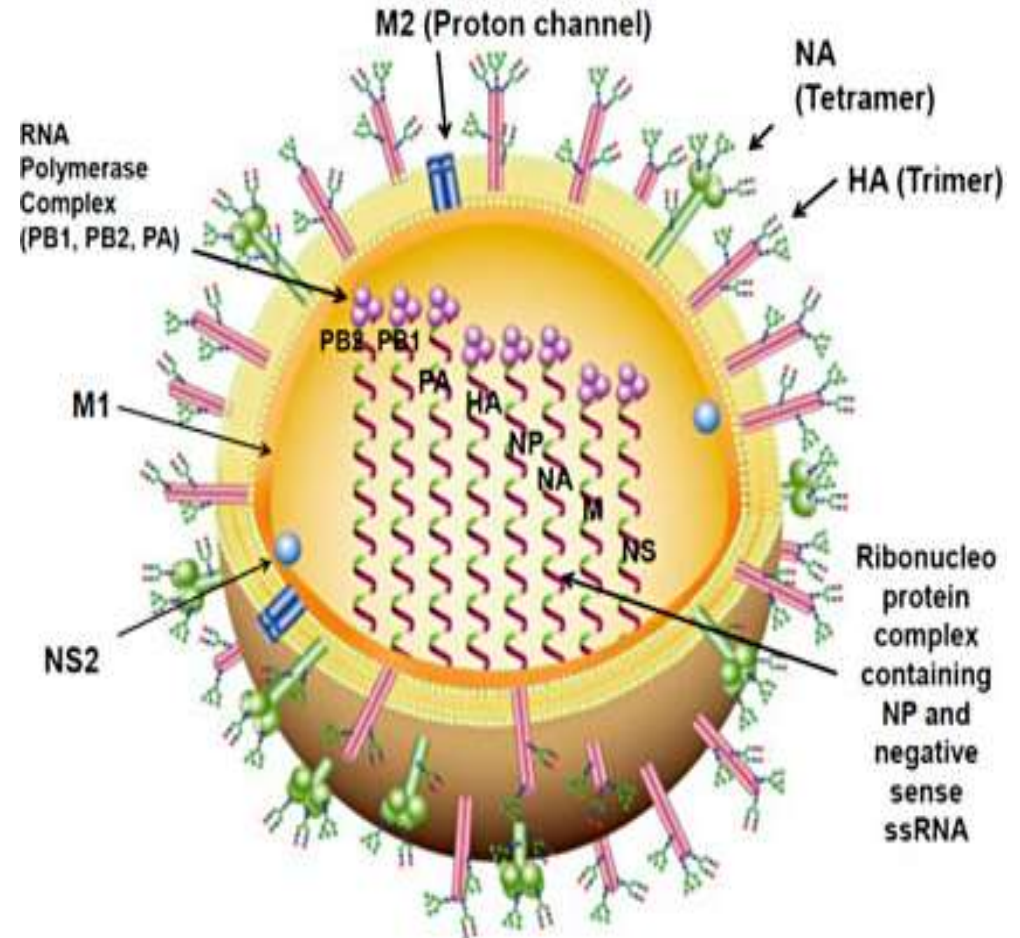
● H5N1

- Since 2003, 637 cases though higher CFR (almost 60%)
- High pathogenicity avian influenza virus
- Very limited human-to-human transmission
- 100 cases: 18 months



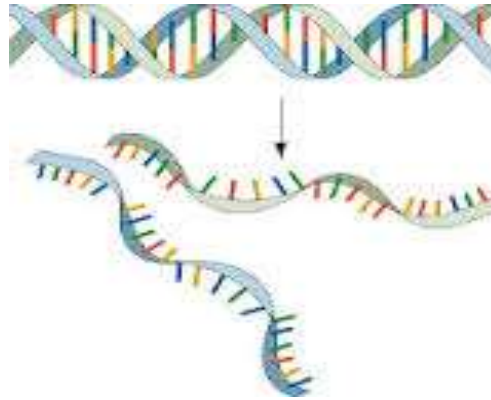
Métodos diagnósticos que hacen uso del genoma del virus

- RT-PCR en tiempo real
- Secuenciación

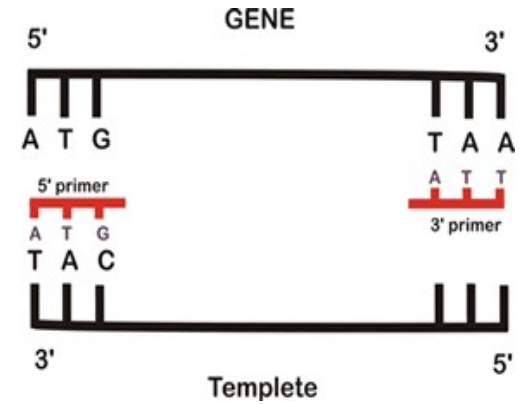




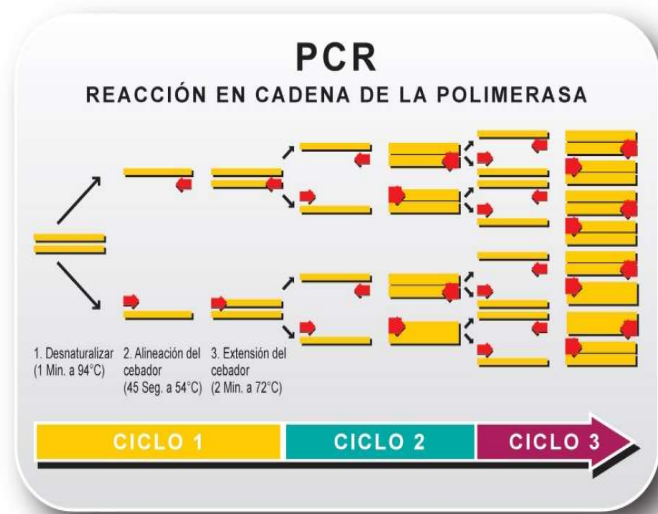
RNA- cDNA



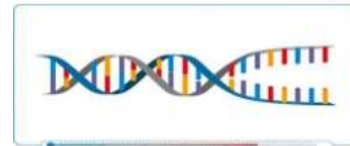
DESNATURALIZACIÓN



ALINEACIÓN



Pasos de la PCR



1° Desnaturalización

95° C 1 minuto

2° Anillamiento

54° C 45 segundos



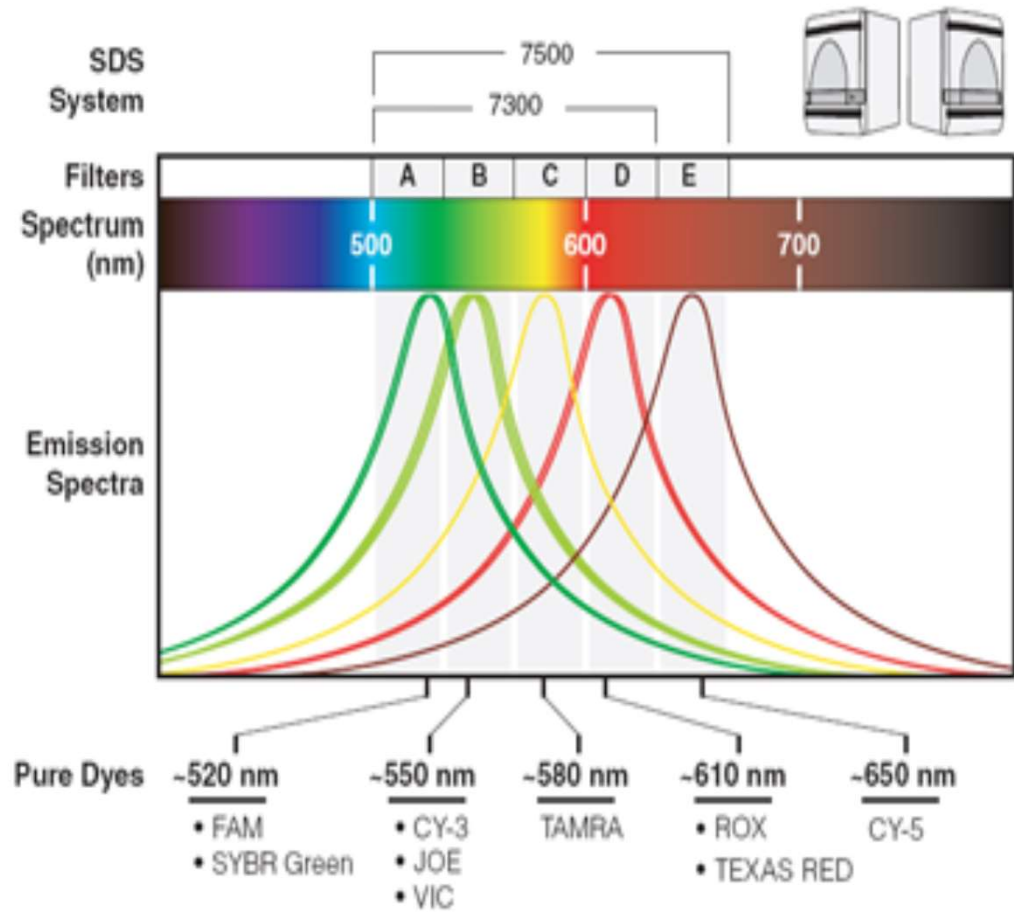
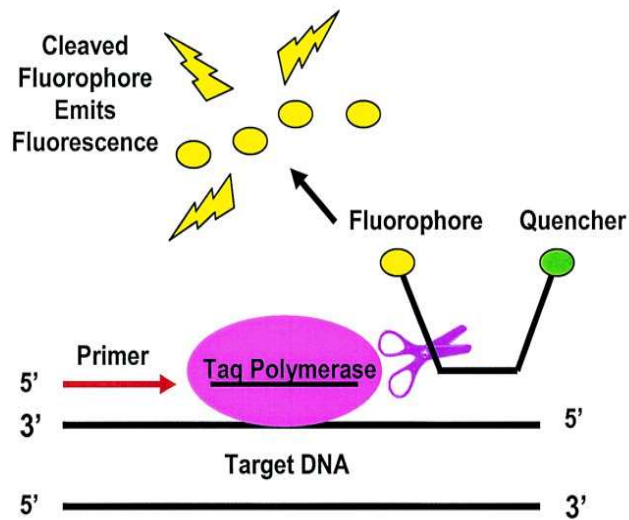
3° Extensión

72° C 2 minutos

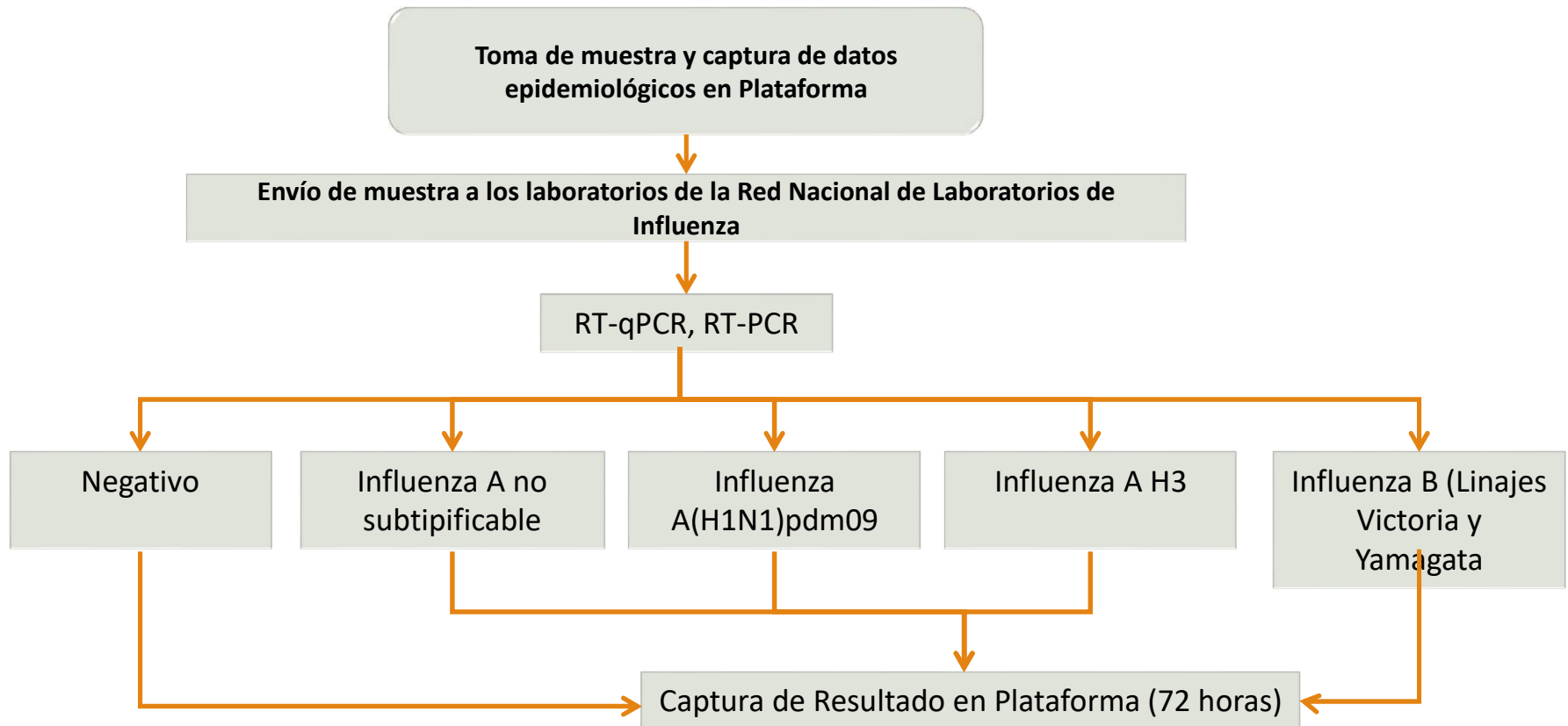


TaqMan PCR: Generación de Señal por Hidrólisis de sonda

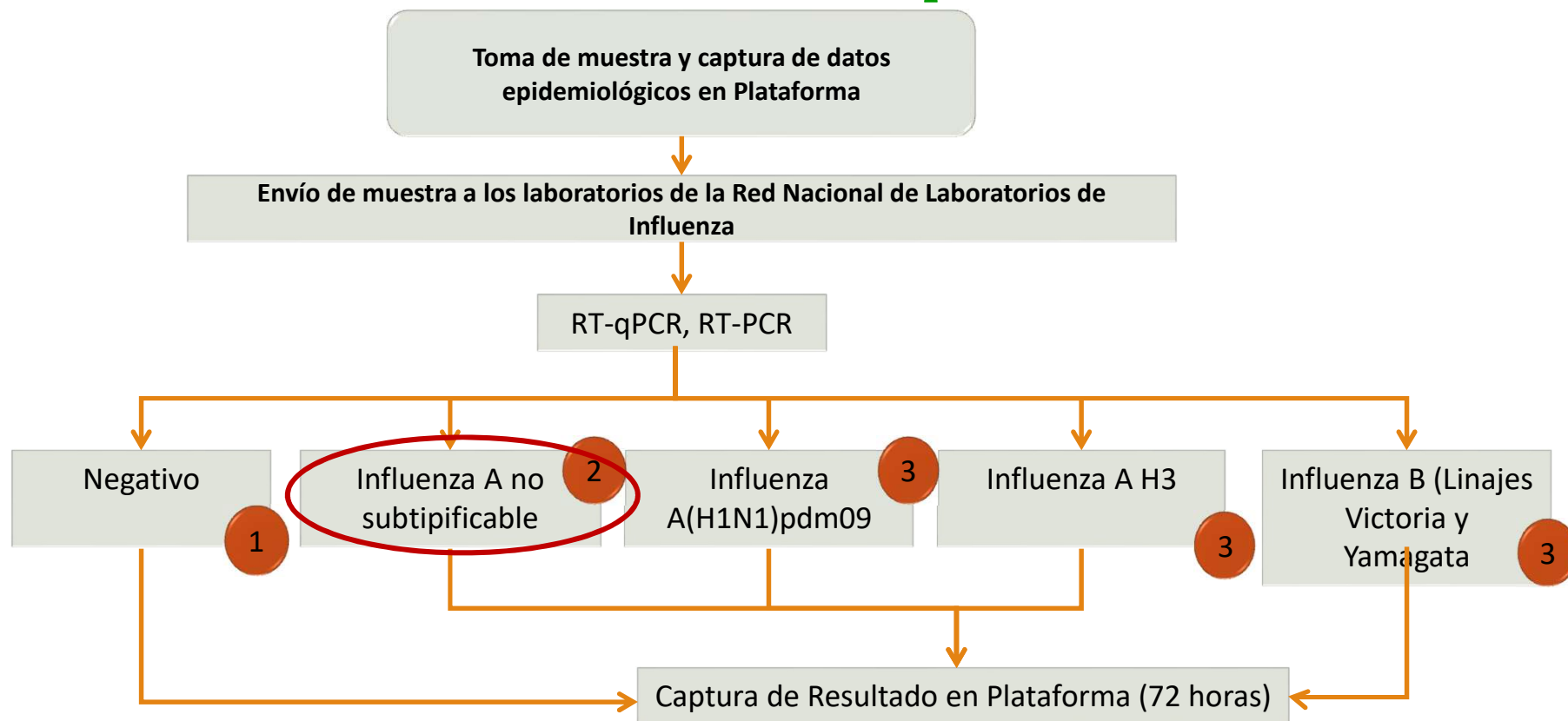
5'Nuclease Oligoprobe (Taqman)



ALGORITMO DE DIAGNOSTICO. RT~qPCR



ALGORITMO DE DIAGNOSTICO. RT~qPCR



- 1 **Diagnóstico diferencial (Búsqueda de Adenovirus, Metapneumovirus, VSR, Parainfluenza 1-4, Coronavirus OC43, NL63, 229E, HKU1, Bocavirus, Enterovirus/Rhinovirus, MERS-CoV.**
- 2 **Aislamiento viral y caracterización por secuenciación (Búsqueda de influenza A(H1N1)pdm09, H3N2, H5N1, H7N3, H7N9, variabilidad antigénica, filogenia y resistencia a inhibidores de la neuraminidasa)**
- 3 **Aislamiento y caracterización por secuenciación (Búsqueda de variabilidad antigénica, filogenia y resistencia a inhibidores de la neuraminidasa)**

Vigilancia de la Resistencia a Inhibidores de la Neuraminidasa del Virus de la Influenza

823

TTATCACTATG Sensitive
TTAT**T**ACTATG Resistance

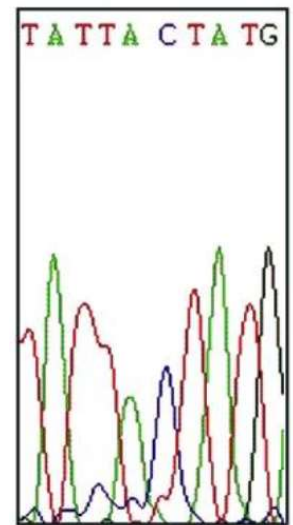
738 muestras independientes

- 328 Sobrenadante de CC 2009
- 124 Sobrenadante de CC 2010
- 10 Biopsias 2009
- 31 NFS 2009 (25 defunciones)
- 199 NFS 2010 (2 defunciones)
- 46 NFS 2011 (Brote Chihuahua)

737 muestras : sensibles a oseltamivir
1 (#797): presenta la mutación H275Y

CT < 32 in HSW
(CDC real time RT-PCR)

275
Y



Oseltamivir-Resistance Surveillance in Pandemic 2009 Influenza A (H1N1) Virus in Mexico. Ramirez-Gonzalez JE, Gonzalez-Duran E, Alcantara-Perez P, Wong-Arambula C, Olivera-Diaz H, Cortez-Ortiz I, et al. **Volume 17, Number 2–February 2010**

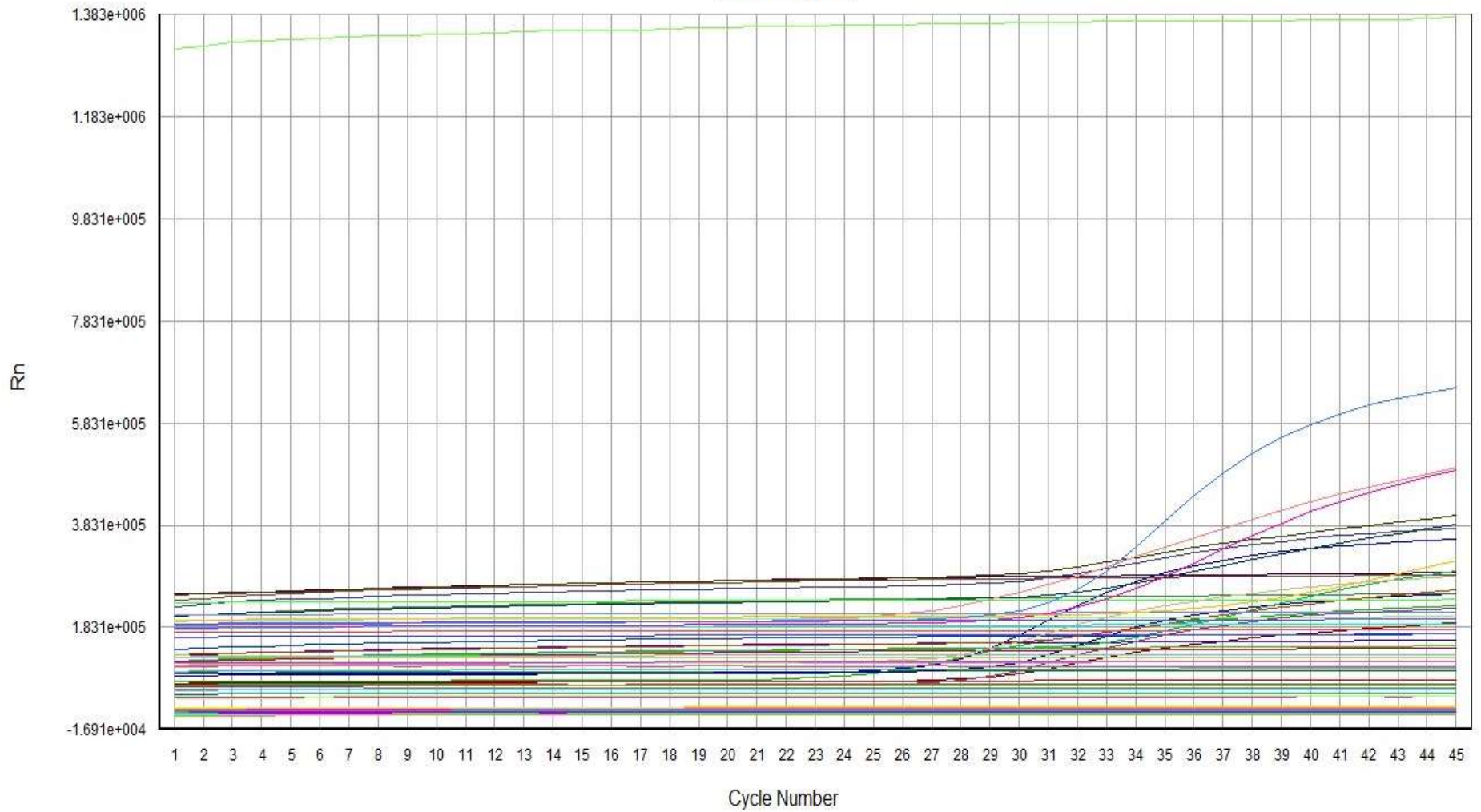
**EMERGING
INFECTIOUS DISEASES®**

Reacciones de qPCR

Reactivos	Volumen por reacción
Agua libre de nucleasas	5.5 ul
Primer Forward	0.5 ul
Primer Reverse	0.5 ul
Sonda	0.5 ul
Enzima Super Script III Platinum	0.5 ul
Buffer 2X pcr Master Mix	12.5 ul
Volumen Total	20 ul



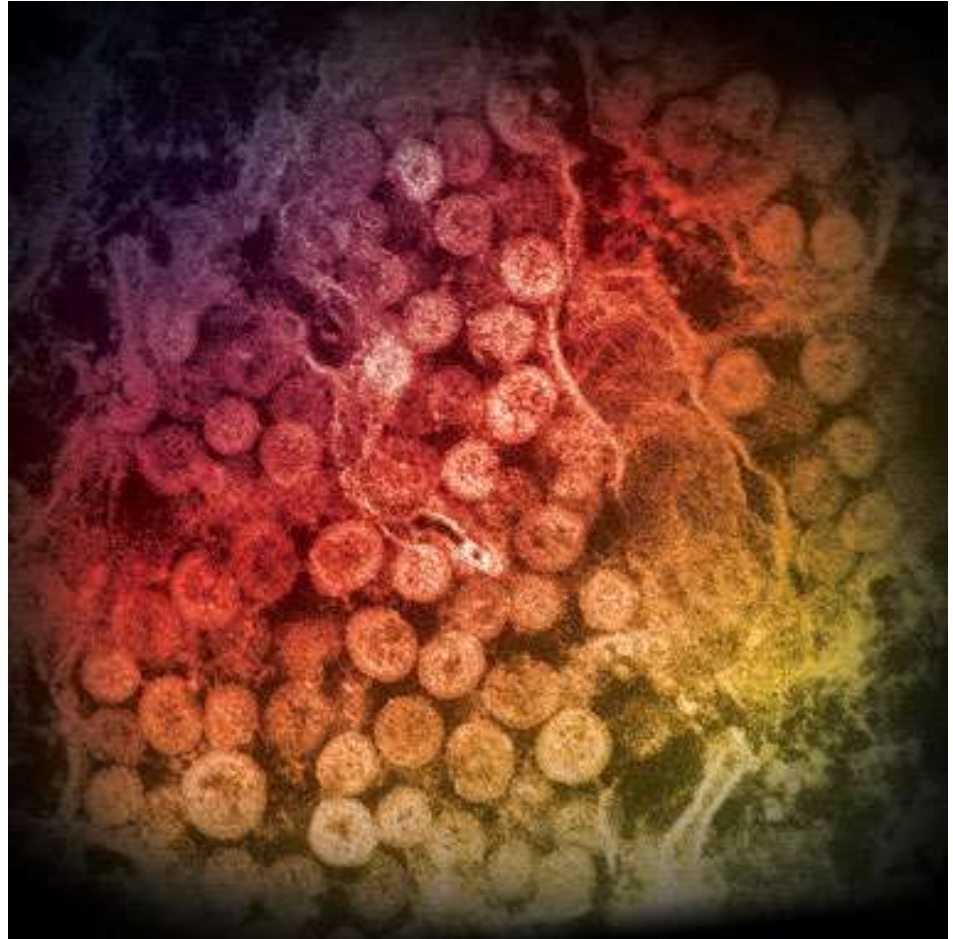
Rn vs Cycle



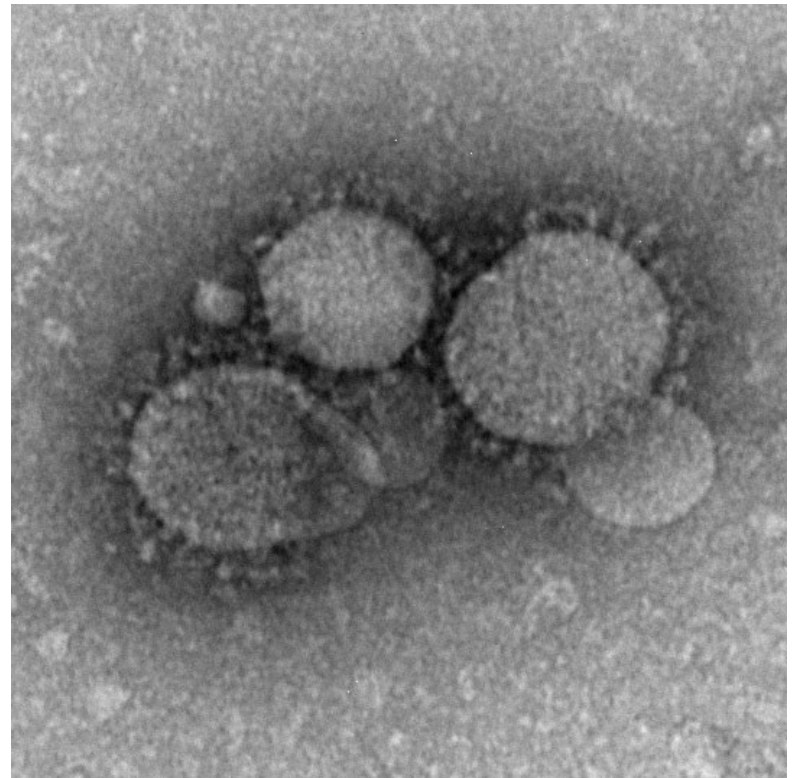
Curvas correspondientes al ensayo de detección de Infa



MERS CoV



- Son virus envueltos con un genoma de ARN de cadena sencilla con polaridad positiva y simetría helicoidal.
- El tamaño genómico de los coronavirus varía entre 16 a 31 kilobases
- Las proteínas de los coronavirus que contribuyen a la estructura del virus son la proteína S, la E1 y E2 (envoltura), la M (membrana), y la proteína N (nucleopcápside).



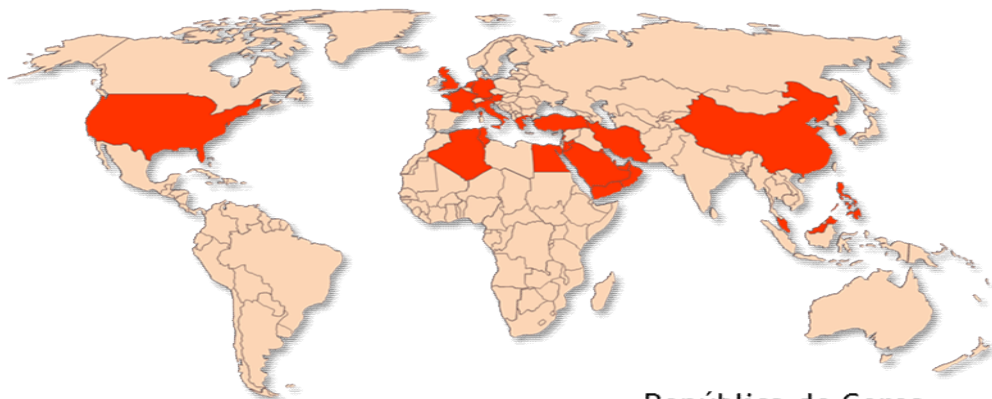
El síndrome respiratorio de Medio Oriente (MERS) es una enfermedad respiratoria viral nueva para los humanos. Desde que se reportó por primera vez en Arabia Saudita en el 2012, el MERS ha causado enfermedades graves e incluso la muerte de personas de varios países.

•Desde 2012, la OMS ha notificado **1864** casos de MERS-CoV confirmados por laboratorio, incluyendo **659** defunciones. (35% de mortalidad).

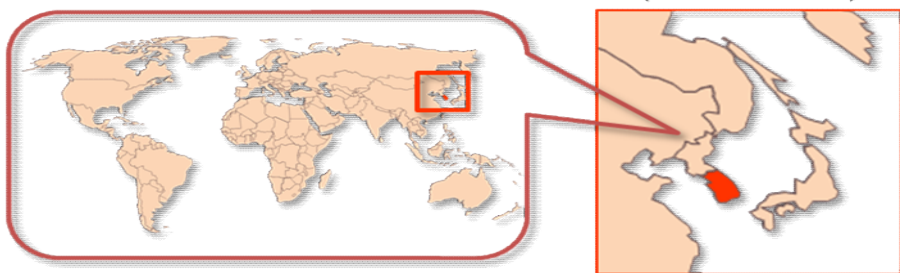
- Es una enfermedad respiratoria viral nueva en los seres humanos.
- La infección por el virus cursa con enfermedad respiratoria aguda grave que provoca fiebre, tos, neumonía, dificultad respiratoria, afectación renal.
- El MERS-CoV es diferente a todos los otros tipos de coronavirus encontrados hasta ahora en los humanos.



■ Países con casos reportados de MERS-CoV.



República de Corea
(Corea del Sur)



Países que han reportado casos de MERS-CoV.

Países en la zona de la Península Arábiga con casos:

- Reino de Arabia Saudita
- Emiratos Árabes Unidos (EAU)
- Qatar
- Omán
- Jordania
- Kuwait
- Yemen
- Líbano
- Irán
- Turquía
- Argelia

Países con casos asociados a los viajes:

- Reino Unido
- Francia
- Países Bajos
- Italia
- Grecia
- Alemania
- Austria
- Malasia
- Filipinas
- Egipto
- Túnez
- Estados Unidos de América (EE.UU.)
- República de Corea (C. del Sur)
- China.

Toma de muestra

- Para aumentar la probabilidad de detección del MERS-CoV la OMS recomienda tomar múltiples muestras de diferentes sitios y en diferentes momentos después de iniciados los síntomas.
- El tipo de muestra dependerá de los días de iniciados los síntomas
- Los síntomas en el momento de la recolección.
- Para limitar la contaminación y el posible contagio del tomador de muestras, todas las muestras deben ser consideradas como potencialmente infecciosas y deben ser tomadas asépticamente, utilizar bata, guantes, lentes de seguridad y mascarilla N-95.
- En caso de derrame, utilizar desinfectantes contra la envoltura del virus, como cloro al 10% o alcohol al 70%.

Tipo de muestra, transporte y conservación para MERS-CoV.

Tipo de muestra	Transporte de muestra
Esputo	Las muestras deben ser conservadas en refrigeración (4-8° C) y enviadas inmediatamente. En caso de que no puedan ser enviadas antes de las 72 hrs, se recomienda la congelación a -70 / -80° C hasta su envío garantizando la congelación.
Lavado bronquio alveolar	
Aspirado traqueal	
Aspirado nasofaríngeo	
Exudado faríngeo	
Exudado nasofaríngeo	
Biopsia o necropsia de origen pulmonar	
Suero	
Heces. Recolectar 2-5 gr de heces (sólidas o líquidas)	

La probabilidad de detección es alta **durante los primeros 7 días** el inicio de síntomas

Dado que la carga viral mas alta ha sido demostrada en las vías respiratorias bajas, las muestras recomendadas incluyen **esputo, lavado broncoalveolar y aspirado traqueal** (cuando sea posible según criterio médico).

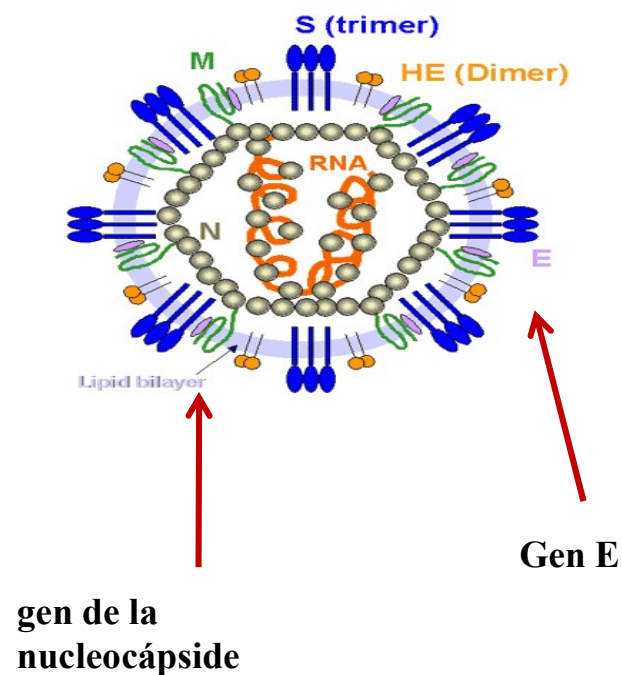
RT-qPCR para MERS-CoV.

El diagnóstico de MERS-CoV se realiza por RT-PCR en tiempo real (Protocolo CDC).

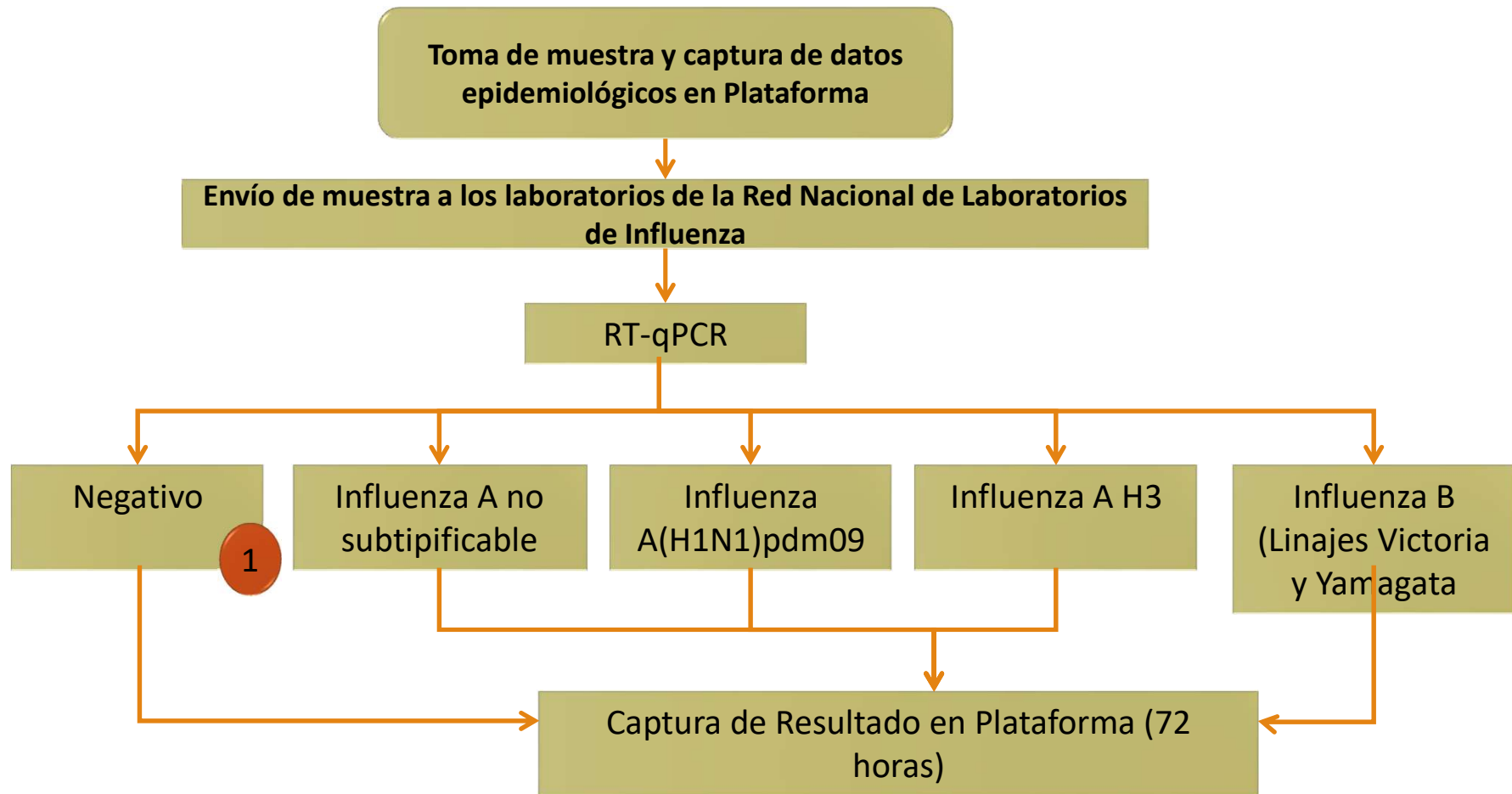
Reactivos enviados por el CDC:

- NCV.UpE Forward Primer
- NCV. UpE Reverse Primer
- NCV. UpE Probe
- NCV.N2 Forward Primer
- NCV.N2 Reverse Primer
- NCV.N2 Probe
- NCV.N3 Forward Primer
- NCV.N3 Reverse Primer
- NCV.N3 Probe
- Control positivo

- Los primers y sondas de NCV.N2 y NCV.N3 están dirigidos a la secuencia del gen de la nucleocápside.
- Los primers y sondas de UpE esta dirigido a la secuencia del gen E que codifica para la proteína de la envoltura.
- La diferencia entre N2 y N3 es sólo su ubicación en el gen N.

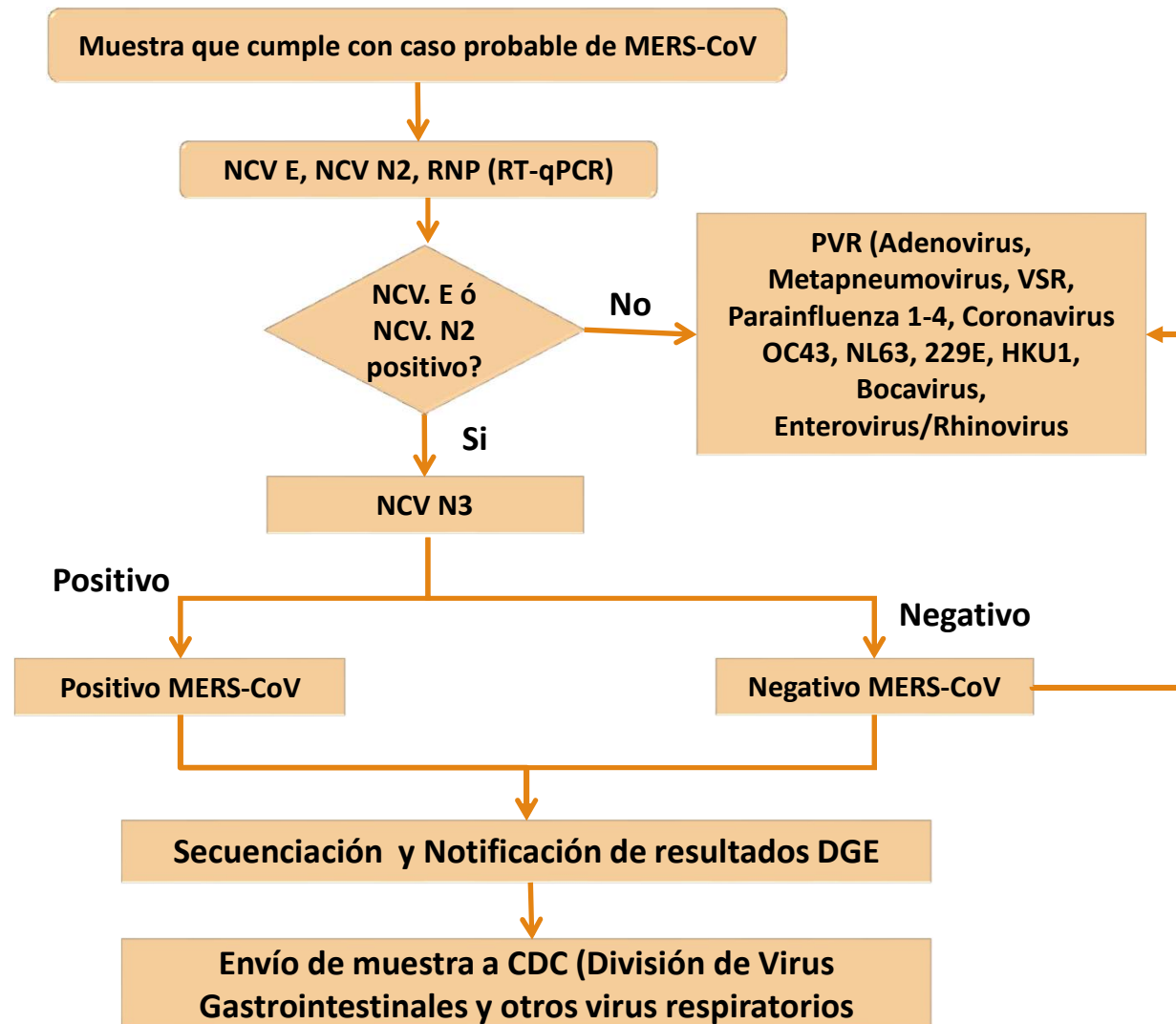


Algoritmo de diagnóstico para MERS-CoV.



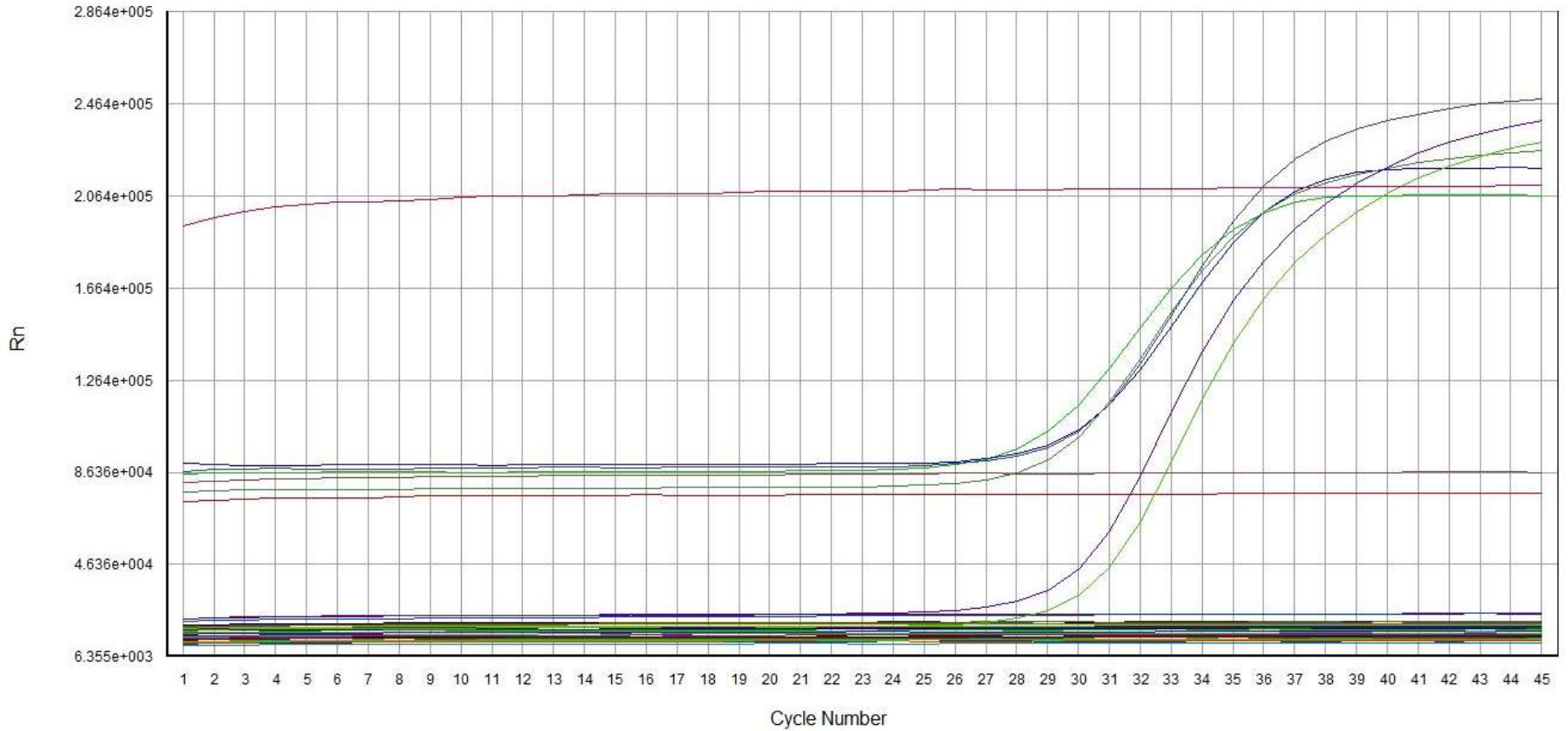
1 Diagnóstico diferencial (Búsqueda de Adenovirus, Metapneumovirus, VSR, Parainfluenza 1-4, Coronavirus OC43, NL63, 229E, HKU1, Bocavirus, Enterovirus/Rhinovirus, **MERS-CoV** (Si cumple con definición operacional de caso probable)).

Algoritmo de diagnóstico para MERS-CoV



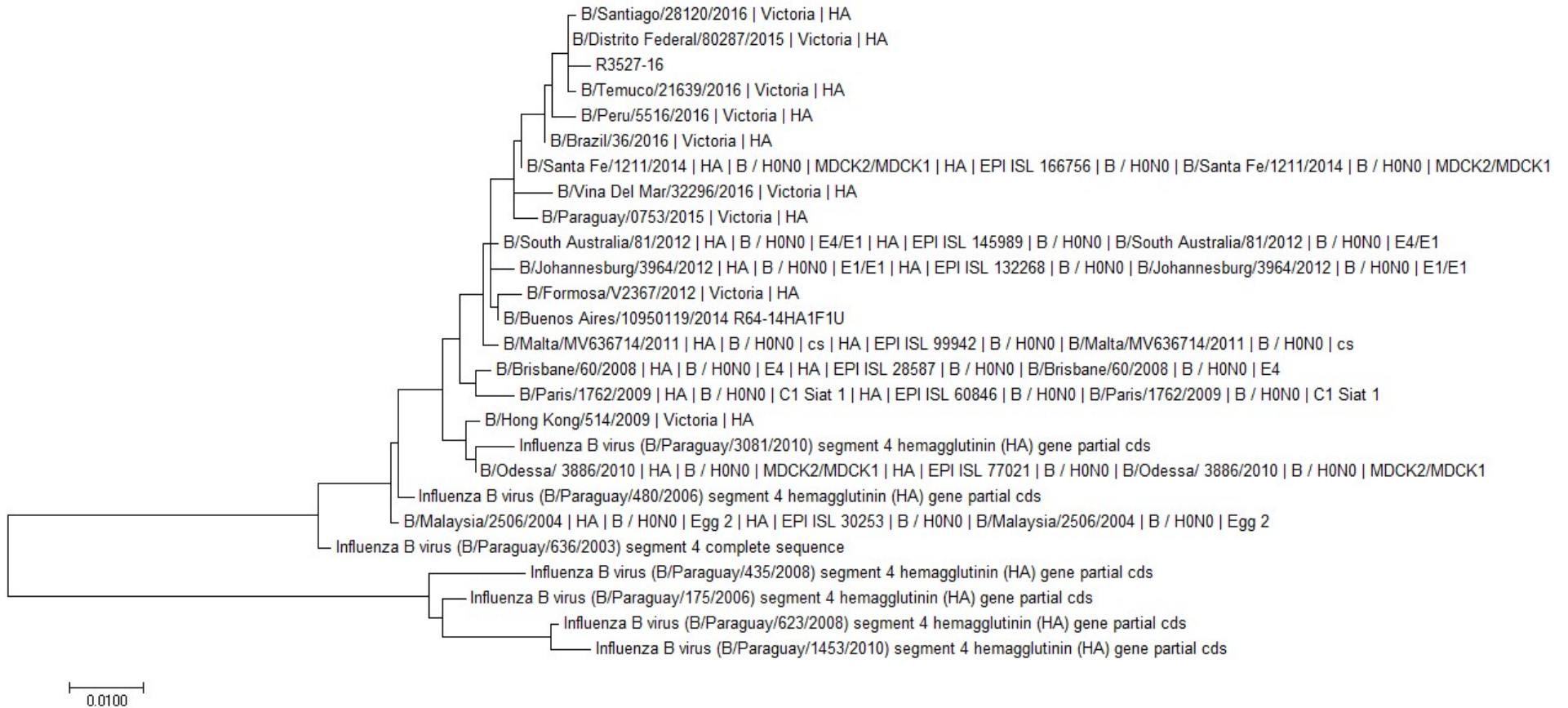
Reacciones de qPCR

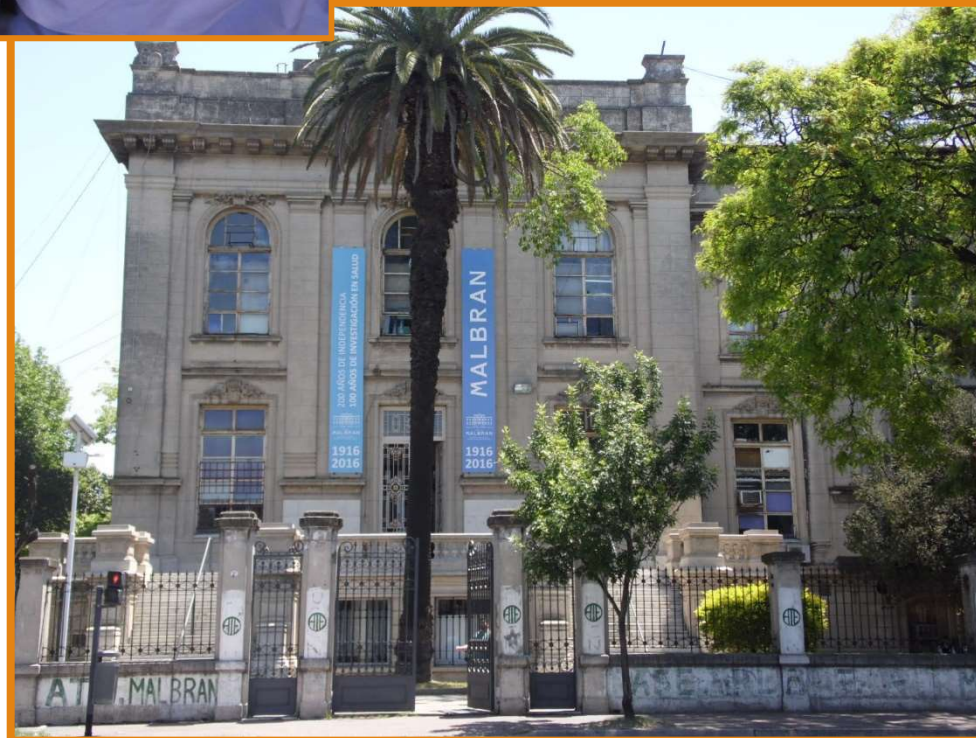
Rn vs Cycle



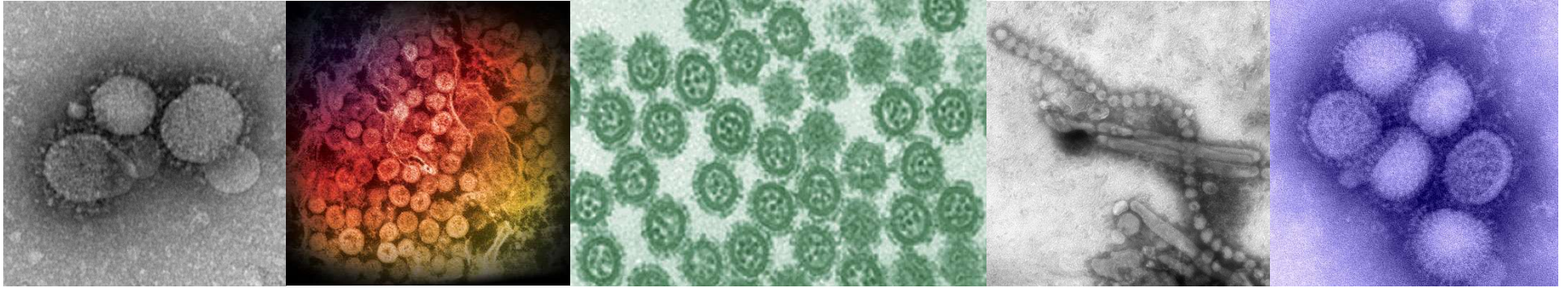
Curvas correspondientes al ensayo de detección de MERSCoV

Secuenciación y análisis Bioinformático





Gracias por su atención



Identificación de virus respiratorios emergentes con potencial pandémico: Influenzavirus A(H7N9) y MERS-CoV

Lic. Edgar Cardozo
Estudiante de Maestría en Ciencias Biomédicas
Dpto. Biología Molecular y Biotecnología

*Programa de Pasantía organizado por ViroRed-CYTED y el INEI-ANLIS (Arg)
Estancia de Vinculación Financiada por el CONACYT*

