

MATRIZ DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ALPHAVIRUS

UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Trabajo de Fin de Maestría Titulado:

**“MATRIZ DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR Y FILOGENIA MOLECULAR DE
ALPHAVIRUS, CON ÉNFASIS EN VIRUS MAYARO”**

Realizado por:

GRACE ELIZABETH ARÉVALO GUERRERO

Director del Proyecto:

Juan Carlos Navarro, Ph.D.

Como requisito para la obtención del título de:

MASTER EN BIOMEDICINA

Quito, 6 de octubre de 2021

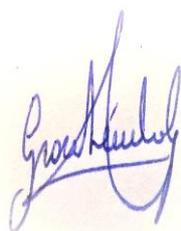
MATRIZ DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ALPHAVIRUS

MATRIZ DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ALPHAVIRUS

DECLARACION JURAMENTADA

Yo, GRACE ELIZABETH ARÉVALO GUERRERO, con cédula de identidad # 1707286207, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.



FIRMA

1707286207

MATRIZ DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ALPHAVIRUS

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

**“MATRIZ DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR Y FILOGENIA MOLECULAR DE
ALPHAVIRUS, CON ÉNFASIS EN VIRUS MAYARO”**

Realizado por:

GRACE ELIZABETH ARÉVALO GUERRERO

como Requisito para la Obtención del Título de:

MAESTRIA EN BIOMEDICINA

ha sido dirigido por el profesor

JUAN CARLOS NAVARRO, Ph.D.

quien considera que constituye un trabajo original de su autor

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Navarro', with a horizontal line underneath.

FIRMA

MATRIZ DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ALPHAVIRUS

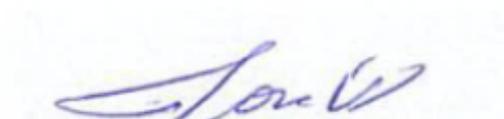
LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

José Rubén Ramírez Iglesias, Ph.D.

Lino Arisqueta Herranz, Ph.D.

Después de revisar el trabajo presentado,
lo han calificado como apto para su defensa oral ante
el tribunal examinador



FIRMA



FIRMA

Quito, 06 de octubre de 2021

DEDICATORIA

A ustedes, la razón de mi ser, los que abrigan mis días e iluminan mis noches, los que jamás se cansan de escuchar, los que siempre tienen para mí una palabra de aliento, los que me enseñan con palabras y hechos que la vida es equilibrio, bondad, paciencia y empatía.

A ustedes, mis padres.

A mi abuelita Virginia que vive en mi mente y en mi corazón.

AGRADECIMIENTO

A mis tíos y a mis primos, que están siempre presentes apoyándome en todas las circunstancias de mi vida.

A María Luisa por su alegría y por cuidarme.

A mi tutor Juan Carlos Navarro por el apoyo técnico y la orientación en la consecución de este trabajo, y por compartir con generosidad sus conocimientos conmigo.

MATRIZ DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ALPHAVIRUS

To be submitted/ Para ser sometido a:

**Matriz de diagnóstico molecular y Filogenia molecular de *Alphavirus*,
con énfasis en virus *Mayaro***

Grace Arévalo^{1*} Juan Carlos Navarro^{1,2}

¹Universidad Internacional SEK, Maestría en Biomedicina, Facultad de Ciencias de la Salud,

gearevalo@uisek.edu.ec

²Universidad Internacional SEK, Grupo de Investigación en Enfermedades Emergentes,

Epidemiología y Biodiversidad, Facultad de Ciencias de la Salud,

juancarlos.navarro@uisek.edu.ec

***Autor de correspondencia:**

Grace Arévalo, gearevalo.mbme@uisek.edu.ec

Título corto: Matriz de diagnóstico molecular de Alphavirus

Running title: Alphavirus Molecular Diagnostic Matrix

MATRIZ DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ALPHAVIRUS

Resumen

El género Alphavirus pertenece a la familia de virus *Togaviridae*, son transmitidos por artrópodos (Arbovirus) y que se clasifican serológicamente en 11 complejos, su distribución geográfica abarca todos los continentes excepto la Antártica. Son virus pequeños y esféricos, poseen envoltura y su genoma es una hebra simple de RNA de sentido positivo de aproximadamente 11 a 12 Kb que codifican proteínas estructurales y no-estructurales.

Las proteínas estructurales E1 y E2 son la diana de numerosas reacciones serológicas y por lo tanto útiles en pruebas inmunológicas de laboratorio, E1 contiene más epítomos conservados y de reacción cruzada.

Los Alphavirus tienen ciclos de transmisión enzoonótica en primates no humanos, aves y roedores. Las anomalías climáticas, la deforestación y el creciente contacto de los seres humanos con los reservorios/vectores animales y la rápida evolución del vector favorecen su expansión y las enfermedades causadas por estos Arbovirus; de ahí que se justifica tener un programa eficaz de control por parte de la salud pública especialmente en los países de América del Sur. Los Alphavirus producen fiebre, pero aquellos que se encuentran en el Viejo Mundo causan artralgia, erupción en la piel y artritis mientras que los del Nuevo Mundo causan principalmente encefalitis, con excepciones como el Mayaro virus (MAYV) y el virus UNA (UNAV).

El MAYV fue detectado por primera vez en cinco pacientes febriles en el condado de Mayaro, Trinidad en 1954 y el principal vector es el mosquito *Haemagogus spp.* Los estudios filogenéticos de las secuencias del MAYV demuestran que puede delimitarse en tres genotipos, denominados D (“widely Dispersed”), L (“Limited”) y N (“New”).

Una investigación de seroprevalencia de MAYV en la Amazonía, ecuatoriana mostró mayor presencia de anticuerpos en las personas nativas del área, así mismo, fue mayor en

MATRIZ DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ALPHAVIRUS

aquellos que se dedican a la caza y también en los de edad mayor a 30, lo cual se asocia con la exposición a ciclos endémicos y enzoóticos de este virus.

El árbol filogenético de Alphavirus muestra a Salmon Pancreas Disease Virus (SPDV) y Sleeping Disease Virus (SDV) como ancestrales, lo cual podría implicar un origen de los Alphavirus en el Océano Pacífico. Los virus del clado de Semliki Complex han sido aislados en el Viejo Mundo, sin embargo, MAYV y UNAV son los únicos que a pesar de pertenecer a dicho clado han sido aislados en el Nuevo mundo. Según algunos autores MAYV fue introducido en América hace aproximadamente 2.000 a 3.000 años producto de la divergencia entre los complejos Semliki y WEEV posiblemente debido a las aves migratorias y los humanos.

Esta investigación describe las relaciones filogenéticas de los Alphavirus, algunos de los cuales producen patologías de importancia veterinaria y humana, y se hace énfasis en MAYV que ha producido brotes epidémicos en Centro y Sudamérica. Se incluyen alphavirus específicos de insectos en la plataforma o matriz de identificación que anteriormente no estaban incluidos en un análisis general.

Es necesario tener una plataforma de identificación molecular para Alphavirus y para Mayaro en caso de realizarse un diagnóstico molecular, esto nos permitiría realizar una identificación rápida de cualquier Alphavirus, incluyendo nuevas introducciones sin tener que recurrir a entidades internacionales.

Palabras clave: Alphavirus, Arbovirus, filogenia, Mayaro

Abstract

The genus Alphavirus belongs to the family of Togaviridae viruses, transmitted by arthropods (Arbovirus), and are serologically classified in 11 complexes. Their geographical distribution covers all continents except Antarctica. They are small and spherical viruses that have an

MATRIZ DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ALPHAVIRUS

envelope, and their genome is a single strand of positive sense RNA of approximately 11 to 12 Kb encoding structural and non-structural proteins.

The structural proteins E1 and E2 are the target of numerous serological reaction, therefore they are useful in immunological laboratory tests, E1 contains more conserved and cross-reactive epitopes.

Alphaviruses have enzootic transmission cycles in non-human primates, birds and rodents.

Climatic anomalies, deforestation, the increasing contact of humans with animal reservoirs/vectors and the rapid evolution of the vector favor their expansion and the diseases caused by these Arboviruses; hence, it is justified to have an effective control program by public health especially in South American countries. Alphaviruses produce fever, but those found in the Old World cause arthralgia, skin rash and arthritis while those in the New World cause mainly encephalitis, with exceptions such as Mayaro virus (MAYV).

MAYV was first detected in five febrile patients in Mayaro County, Trinidad in 1954, and the main vector is the mosquito *Haemagogus* spp. Phylogenetic studies of MAYV sequences show that it can be delimited into three genotypes, termed D ("widely Dispersed"), L ("Limited") and N ("New").

An investigation of the seroprevalence of MAYV in the Ecuadorian Amazon showed a higher presence of antibodies in the native people of the area, as well as in those who are engaged in hunting, also in those over 30 years of age, which is associated with the exposure to endemic and enzootic cycles of this virus.

The Alphavirus phylogenetic tree shows Salmon Pancreas Disease Virus (SPDV) and Sleeping Disease Virus (SDV) as ancestral, which could imply an origin of Alphaviruses in the Pacific Ocean. The viruses of the Semliki Complex clade have been isolated in the Old World, however, MAYV and UNAV are the only ones that despite belonging to this clade have been isolated in the New World. According to some authors, MAYV was introduced in

MATRIZ DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ALPHAVIRUS

America approximately 2,000 to 3,000 years ago as a result of the divergence between the Semliki and WEEV complexes, possibly due to migratory birds and humans.

This research describes the phylogenetic relationships of Alphaviruses, some of which produce pathologies of veterinary and human importance, with emphasis on MAYV which has produced epidemic outbreaks in Central and South America. Insect-specific alphaviruses are included in the identification platform or matrix that were not previously included in a general analysis.

It is necessary to have a molecular identification platform for Alphavirus and for Mayaro in case of molecular diagnosis, this would allow us to make a quick identification of any Alphavirus, including new introductions, without having to route to international entities.

Key words: Alphavirus, Arbovirus, phylogeny, Mayaro

MATRIZ DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ALPHAVIRUS

Introducción

La familia de virus *Togaviridae* está compuesta por dos géneros *Rubivirus* y *Alphavirus* (Lavergne et al., 2006), este último contiene 31 especies de virus que son transmitidos por artrópodos (Arbovirus) y que se clasifican serológicamente en 11 complejos (Hermanns et al., 2020). Su distribución geográfica abarca todos los continentes excepto la Antártica, y las especies están restringidas por condiciones ecológicas específicas, así como del vector y el hospedador (Powers et al., 2001) entre los que se incluyen mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces (Hermanns et al., 2020). Pueden ser categorizados como virus del Nuevo y Viejo Mundo, ambos producen una enfermedad febril pero en el primer caso se asocia con encefalitis mientras que en el segundo con artralgia (Auguste et al., 2015).

Los Alphavirus son virus pequeños, poseen envoltura y su forma es esférica, su genoma es una hebra simple de RNA de sentido positivo de aproximadamente 11 a 12 Kb con una estructura Cap0 en su extremo 5' y una cola de poli A en el extremo 3', tiene dos marcos abiertos de lectura (ORF) que codifican para las proteínas estructurales y no-estructurales (Pietilä et al., 2017).

Las proteínas no estructurales (nsPs) son cuatro, cada una de ellas cumple diferentes roles, nsP1 es la enzima de recubrimiento y el ancla de membrana del complejo de replicación, nsP2 es una RNA- helicasa responsable del procesamiento de las poliproteínas no-estructurales, nsP3 interactúa con proteínas del hospedero y en procesos de ribosilación; finalmente, nsP4 es el elemento central de la RNA-polimerasa dependiente de RNA (RdRp). Las proteínas estructurales (E1 y E2) son traducidas del ARNm subgenómico que se encuentra en el primer tercio hacia el extremo 3' (Powers et al., 2001) y conducen al empaquetamiento del ARN genómico viral en la nucleocápside en formación (Pietilä et al., 2017). Las proteínas E1 y E2 son la diana de numerosas reacciones serológicas y por lo tanto útiles en pruebas inmunológicas

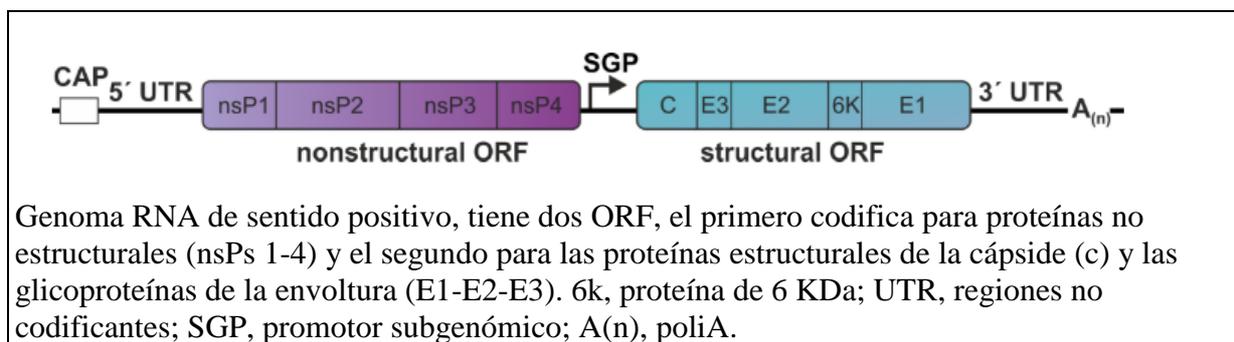
MATRIZ DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ALPHAVIRUS

de laboratorio; E2 es el sitio de la mayoría de los epítomos neutralizantes, mientras que E1 contiene más epítomos conservados y de reacción cruzada (Powers et al., 2001).

Los ORF están enmarcados por regiones no codificantes (UTR), en la mayoría de Alphavirus en el extremo 3'-UTR se observa secuencias repetidas que al parecer facilitan la infección de insectos vectores (Hermanns et al., 2020).

Figura 1.

Estructura del genoma de Alphavirus



Nota: Adaptado de Alphavirus polymerase and RNA replication (p.36) Pietilä et al., 2017, Virus Research

Los Alphavirus tienen ciclos de transmisión enzoonótica en primates no humanos, aves y roedores, su propagación a los humanos ocurre generalmente en áreas rurales, pero se podría volver urbana como ha sucedido con CHIKV (Navarro, Juan-Carlos, Carrera, Jean-Paul, Liria & Auguste, 2017), las anomalías climáticas, la deforestación, el creciente contacto de los seres humanos con los reservorios/vectores animales y la rápida evolución del vector favorecen su expansión (Lorenz et al., 2019), por esta razón, las enfermedades causadas por Arbovirus justifican tener un programa eficaz de control por parte de la salud pública especialmente en los países de América del Sur (Terzian et al., 2015).

El primer Alphavirus aislado en América Latina fue el de West Equine Encefalitis (WEEV) en 1930, luego el Eastern Equine Encefalitis (EEEV) en 1933 y posteriormente el virus de la Encefalitis Equina Venezolana (VEEV) en 1938, otros virus encontrados son el

MATRIZ DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ALPHAVIRUS

Mayaro (MAYV), Aura (AURAV), Una (UNAV), Trocara virus (TROV), y el Chikungunya virus (CHIKV) (Navarro, Juan-Carlos, Carrera, Jean-Paul, Liria & Auguste, 2017). Es llamativo que los Alphavirus encontrados en el Viejo Mundo causan artralgia, erupción en la piel y artritis mientras que los del Nuevo Mundo causan principalmente encefalitis, sin embargo, hay excepciones como el Mayaro virus (Lavergne et al., 2006).

El MAYV fue detectado por primera vez en cinco pacientes febriles en el condado de Mayaro, Trinidad en 1954 y desde entonces ha dado lugar a algunos brotes en comunidades rurales de Brasil, Bolivia y Perú; en 2010 se presentó un brote en el Estado de La Portuguesa, Venezuela, con 77 casos (Auguste et al., 2015) y también ha sido aislado, o se ha encontrado anticuerpos anti-Mayaro en Colombia, Ecuador, Surinam y Guyana Francesa (Auguste et al., 2015), pero además en Haití y México lo indica que el virus ha extendido su alcance (Mavian et al., 2017). La infección por MAYV está asociada a la exposición de humanos a entornos de selva tropical por razones ocupacionales o recreativas como el turismo que atrae visitas nacionales e internacionales para excursiones forestales, lo cual favorece la posibilidad de infección y a su vez su propagación (Terzian et al., 2015). También, la proximidad geográfica, el clima, las especies de mosquitos vectores y la gran plasticidad de MAYV de infectar un amplio rango de vertebrados favorece la zoonosis en la Amazonía (Mavian et al., 2017). Es una enfermedad enzoonótica entre vertebrados y primates no-humanos, y el principal vector es el mosquito *Haemagogus spp* (Lavergne et al., 2006), si el MAYV pudiera usar como vectores a *Ae. aegypti* o *Ae. albopictus* podría ser una amenaza global (Navarro, Juan-Carlos, Carrera, Jean-Paul, Liria & Auguste, 2017). Se han realizado ensayos de laboratorio para evaluar la competencia de estos en vectores antropófilos y, los estudios mostraron que aunque MAYV puede infectar a *Aedes albopictus* y a *Aedes aegypti*, en este último la transmisión del MAYV a los seres humanos es baja, aun así, sugiere un potencial de transmisión urbana (Ganjian & Riviere-Cinnamond, 2020).

MATRIZ DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ALPHAVIRUS

Lorenz et al. señala que el estudio del comportamiento de alimentación del vector *Haemagogus* muestra que también se alimenta de aves, vacas y caballos, esta abundancia de hospederos también es un importante factor de riesgo, por ejemplo, en la población de Cerrado, Brasil donde los ganaderos sueltan sus rebaños cerca de la zona forestal.

El genoma del MAYV tiene una longitud de 11.429 nucleótidos excluyendo la cola de poly A 3', las dos terceras partes del extremo 5' corresponde al locus de las polimerasas mientras que el primer tercio del extremo 3' corresponde a las proteínas estructurales. El marco de lectura es interrumpido por un codón de parada en el extremo C terminal de la región nsP3 causando una escisión que ha sido descrita en la mayoría de Alphavirus (Lavergne et al., 2006). La replicación del virus ocurre en el citoplasma y su maduración por gemación a través de la membrana plasmática, donde se asimilan las glicoproteínas de superficie E2 y E1, estas dos glicoproteínas son el objetivo de numerosas reacciones y pruebas serológicas (Powers et al., 2001). Los estudios filogenéticos de las secuencias del MAYV demuestran que puede delimitarse en tres genotipos, denominados D (“widely Dispersed”), L (“Limited”) que abarca un amplio rango geográfico-temporal entre 1955-1991 de Brasil y Haití ;y N tercer genotipo menor N (“New”), que consiste en una sola secuencia aislada en el Perú en el 2010 (Blohm et al., 2019; (Mavian et al., 2017).Las cepas del genotipo D están muy conservadas, en todo el genoma, entre el 96,4% y el 100% de identidades de secuencias de nucleótidos y entre el 97,7% y el 100% de identidades de secuencias de aminoácidos (Navarro, Juan-Carlos, Carrera, Jean-Paul, Liria & Auguste, 2017).

MAYV está relacionado con Chikungunya Virus (CHIKV), que también causa una enfermedad febril aguda, acompañada de artralgia que puede persistir por años, pero difiere de él en que se transmite en ciclos humano-mosquito-humano en áreas urbanas. Produce epidemias afectando millones de personas con una eficiente propagación mediante viajeros por vía aérea y produce un impacto económico cuando, debido a los síntomas, las personas no pueden

MATRIZ DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ALPHAVIRUS

trabajar. Actualmente, la medida para prevenir la infección y la propagación de CHIKV, es el control de los vectores, pero la existencia de una vacuna ayudaría a limitar no solo la enfermedad por este virus sino también la de MAYV porque existe reactividad cruzada antigénica (Navarro, Juan-Carlos, Carrera, Jean-Paul, Liria & Auguste, 2017).

MAYV está incluido en el complejo Semliki Forest, un grupo serológico del género Alphavirus que comparte sitios antigénicos comunes y puede dar lugar a reactividad cruzada (Acosta-Ampudia et al., 2018) produce la Fiebre de Mayaro (Mavian et al., 2017) que se caracteriza por causar fiebre, artralgia, manifestaciones en la piel y aunque la enfermedad es de intensidad moderada, puede dejar una secuela de artralgia severa (Blohm et al., 2019). Otros síntomas asociados pueden ser cefalea, mialgia, dolor retro-ocular, vómito y diarrea que son difíciles de distinguir de los causados por otros virus como Dengue, Zika y Chikungunya causando un subregistro de los casos de Mayaro (Ganjian & Riviere-Cinnamond, 2020).

Para el diagnóstico serológico existen varias técnicas que utilizan células infectadas por el virus, antígenos recombinantes de proteínas estructurales o no estructurales, o del virus completo. También hay ensayos inmunológicos que detectan y diferencian entre anticuerpos IgM, que se detecta desde los 3 días después del inicio de los síntomas y dura 3 meses, e IgG que persiste durante años (Acosta-Ampudia et al., 2018). Por otro lado, la identificación de Alphaviruses por métodos de diagnóstico molecular provee información de los ciclos de transmisión y sus patrones epidemiológicos, PCR o RT-PCR tienen alta especificidad y sensibilidad en etapas tempranas de la viremia presentes generalmente entre 2 a 6 días después de la infección, luego se puede hacer una PCR anidada o combinarlo con exámenes de Ensayo Inmuno Enzimático (ELISA) para detectar específicamente MAYV (Acosta-Ampudia et al., 2018).

La presencia de MAYV puede estar subestimada, la determinación de la incidencia real es primordial en América del Sur, para lo cual se deben realizar pruebas de detección cuando

MATRIZ DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ALPHAVIRUS

los pacientes presentan una enfermedad parecida al dengue (Auguste et al., 2015). Brunini et al (2017) señala que, en muestras tomadas en Goiânia-Brasil es llamativa la presencia de IgM en pacientes febriles y que estas infecciones recientes son probablemente adquiridas en zonas rurales y bosques alrededor de la ciudad; lo que podría indicar presencia de focos activos que han establecido un ciclo selvático de MAYV en donde los pequeños primates jugarían un rol como amplificadores del virus.

La potencial presencia de MAYV en el Ecuador fue investigada por Izurieta et al.(2011) mediante la búsqueda de anticuerpos en la sangre del personal militar de una guarnición Amazónica, se encontró la presencia de infección por Alphavirus y aunque la prueba de ELISA utilizada no puede determinar por sí sola que se trata de MAYV, los datos clínicos y epidemiológicos sí sugieren la presencia de este virus. La seroprevalencia fue mayor en las personas nativas de la Amazonía en relación con el personal que proviene de otras ciudades del Ecuador. Así mismo, fue mayor en aquellos que se dedican a la caza y también en los de edad mayor a 30, lo cual se asocia a mayor tiempo de residencia en la Amazonía y por lo tanto exposición a ciclos endémicos y enzoóticos de MAYV.

Los estudios de seroprevalencia indican que MAYV es endémico en Sudamérica por ello es necesario tener una plataforma de identificación molecular para Alphavirus en general y para Mayaro en particular, porque nos permitiría realizar una identificación rápida a partir de un aislamiento-PCR y /o secuenciación, sin tener que recurrir a instituciones externas al Ecuador.

El estudio filogenético de los Alphavirus nos permite conocer sus características epidemiológicas y la relación de MAYV con los otros miembros de su clado para determinar su origen entre el Nuevo y Viejo Mundo. Los estudios de seroprevalencia indican que MAYV es endémico en Sudamérica y produce una enfermedad con síntomas similar al dengue por lo que probablemente es diagnosticada como tal y se produce un subregistro de casos. Además,

MATRIZ DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ALPHAVIRUS

es de bajo impacto económico, lo cual no motiva interés para el desarrollo de una vacuna puesto que se presenta por brotes periódicos u ocasionales.

El objetivo principal de este trabajo es desarrollo una plataforma de identificación molecular para Alphavirus y para Mayaro pues se conoce, por la presencia de anticuerpos, que circula en Ecuador, esta nos permitiría realizar una identificación rápida de cualquier Alphavirus, incluyendo nuevas introducciones, a partir de un aislamiento-PCR y secuenciación, sin tener que recurrir a entidades internacionales.

Materiales y Métodos

Muestreo o recolección de secuencias

El análisis filogenético se basó en secuencias completas o estructurales de poliproteínas, primero se realizó una búsqueda de secuencias de la proteína estructural E1 de Alphavirus, ya que contiene más epítomos conservados. Su nombre, abreviatura, las secuencias utilizadas y su número de acceso en la página del NCBI-Nucleotide por sus siglas en inglés (National Center for Biotechnology Information), se detallan en la tabla No.1; se tomó como base la investigación de Powers et.al. (2001) y Hermanns et.al. (2020). Las secuencias fueron alineadas en el programa MacVector por el método Clustal W y posteriormente se generó un árbol filogenético con base en un algoritmo heurístico para el análisis de máxima parsimonia.

Posteriormente, se repitió el proceso para la búsqueda de secuencias del genoma completo de MAYV con base en el estudio de Auguste et.al. (2015).

Construcción de matriz y alineamiento de secuencias

Se realizó un alineamiento de secuencias con la matriz de 51 secuencias X 1042 pares de bases, mediante Clustal W en MacVector en la búsqueda de una matriz de trabajo con homologías posicionales, con parámetros de alineamiento de Gap Open Penalty (GOP) de 30.0 y de Gap Extension Penalty (GEP) de 15.0 con la finalidad de darle peso a las homologías.

MATRIZ DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ALPHAVIRUS

Análisis Filogenéticos

Se realizó un análisis de Máxima Parsimonia para la construcción de soluciones óptimas mediante árboles de Wagner, con 1000 réplicas de adición de taxa y caracteres al azar, y barrido de ramas con TBR (Tree Bisection and Reconnection) para la búsqueda de islas de árboles parsimoniosos. Posteriormente se realizó un repesaje por pesado sucesivo mediante el índice recalculado I_{rx}IC (Farris 1969). Finalmente, se realizaron 500 pseudoréplicas de remuestreo por el método de Bootstrap (Felsenstein 1985) para determinar el nivel de confianza y apoyo de clados o grupos

Tabla 1. Alphavirus estudiados

Nombre	Cepa	Origen	Año	Código de acceso NCBI
Barmah Forest Virus	BFV	Australia	1974	U73745
Encefalitis Equina del Este Virus	EEEV1	Florida	1982	U01034
Encefalitis Equina del Este Virus	EEEV2	Brasil	1956	AF159559
Encefalitis Equina del Este Virus	EEEV3	Panamá	1986	AF159560
Encefalitis Equina del Este Virus	EEEV4	Brasil	1985	AF159561
Middelburg Virus	MIDV	África del Sur	---	AF398374
Nombre	Cepa	Origen	Año	Código de acceso NCBI
Ndmu Virus	NDUV	África del Sur	1959	AF398375
Bebaru Virus	BEBV	Malasia	---	AF398376
Chikungunya Virus	CHIKV	Tanganyka	1953	AF192905
Getah Virus	GETV	Malasia	1955	AF398377
Mayaro Virus	MAYV	Trinidad	1954	AF398378
O' nyong nyong Virus	ONNV	Uganda	1959	M20303
Ross River Virus	RRV	Australia	1959	M20162

MATRIZ DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ALPHAVIRUS

Nombre	Cepa	Origen	Año	Código de acceso NCBI
Semliki Forest Virus	SFV	NR	---	X04129
Me Tri virus	Me Tri	Vietnam	1981	AF398380
UNAV virus	UNAV	Colombia	1964	AF398381
Encefalitis Equina Venezolana Virus	VEEV (IAB)	Trinidad	1943	L01442
Encefalitis Equina Venezolana Virus	VEEV (IC)	Venezuela	1963	L04653
Encefalitis Equina Venezolana Virus	VEEV (ID)	Panamá	1961	L00930
Encefalitis Equina Venezolana Virus	VEEV (IE)	Guatemala	1968	U34999
Encefalitis Equina Venezolana Virus	VEEV (IF)	Brasil	1978	AF398382
Everglades Virus	EVEV	Florida	1963	AF075251
Mucambo Virus	MUCV	Brasil	1954	AF398383
Tonate Virus	TONV	Guyana Francesa	1973	AF398384
BB Virus	Bijou Bridge	Colorado	1974	AF398385
Encefalitis Equina Venezolana Virus	VEEV (IIIC)	Perú	1971	AF398386
Pixuna Virus	PIXV	Brasil	1961	AF075256
Cabassou Virus	CABV	Guyana Francesa	1968	AF398387
Encefalitis Equina Venezolana Virus	VEEV (VI)	Argentina	1980	AF398388
Aura Virus	AURAV	Brasil	1959	AF126284
Sindbis Virus	SINV	NR	2018	NC_001547
Babanki Virus	BBKV	Cameroon	1969	AF398391
Kyzylgach Virus	KYZV	Azerbaijan	1969	AF398392
Ockelbo Virus	Ockelbo	Suecia	1982	M69205
Whataroa Virus	WHAV	Nueva Zelanda	1962	AF398394
Fort Moran Virus	FMV	Colorado	1973	AF398389

MATRIZ DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ALPHAVIRUS

Buggy Creek Virus	BCRV	Oklahoma	1981	AF398390
Highlands J Virus	HJV	Florida	1964	U52586
Encefalitis Equina del Oeste Virus	WEEV (BFS1703)	California	1953	J03854
Encefalitis Equina del Oeste Virus	WEEV (Ag80- 646)	Argentina	1980	AF398393
Trocará Virus	TROCV	Brasil	1984	AF252264
Sleeping Disease Virus	SDV	Francia	2000	AJ238578
Salmon Pancreas Disease Virus	SPDV	Reino Unido	---	AJ012631
Southern Elephant Seal Virus	SESV	NR	---	NC_016960
Agua Salud Alphavirus	ASALV	Panamá	2013	MK959114
Taï Forest Alphavirus	TALV	Costa de Marfil	2004	NC_032681
Eilat Virus	EILV	Israel	1982	NC_018615
Mwinilunga Alphavirus	MWAV	Zambia	2016	LC361437
Madariaga Virus	MADV	Brasil	1956	NC_023812
Río Negro Virus	RNV	Argentina	1980	AF075258
Mosso das Pedras Virus	MDP	Brasil	1978	AF075257

Resultados

Filogenia de Alphavirus

El árbol filogenético de Alphavirus construido por el método de máxima parsimonia con base en la proteína estructural E1 alcanzó un índice de retención (IR) de 0,9 y un índice de consistencia (IC) de 0,85 con una longitud (L) de 9,111.

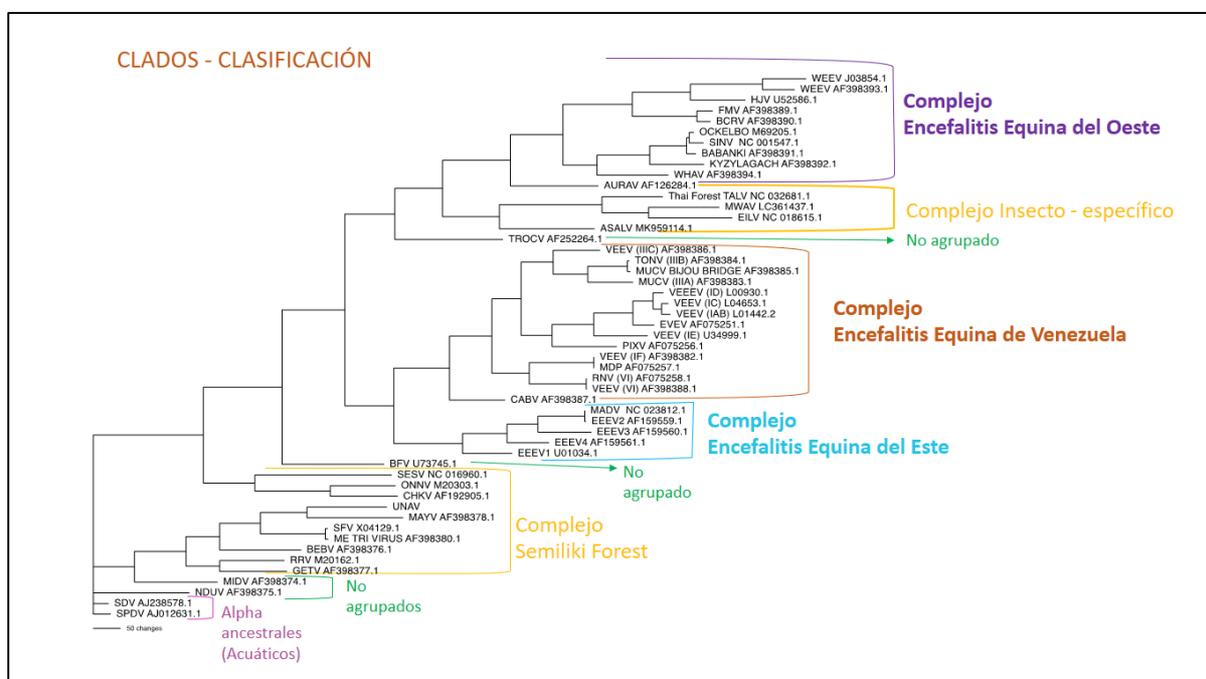
Como podemos observar en la figura 2, en la base de estructura del árbol filogenético de Alphavirus se ubicaron los virus SPDV y SDV como grupos externos, ambos pueden ser considerados como ancestrales (Powers et al., 2001). Luego, hacia lo más interno del árbol o

MATRIZ DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ALPHAVIRUS

grupos derivados, se obtuvo clados de virus que corresponden a los siguientes complejos antigénicos: Ndumu, Middelburg, Semiliki Forest, Barmah Forest, Encefalitis Equina del Este, Encefalitis Equina de Venezuela, Trocara y Encefalitis Equina del Oeste. El complejo de NDUV está fuera del clado de Semiliki Forest y al igual que el de MIDV coincidiendo con Powers et.al (2001); y similar los resultados de Esposito & Fonseca (2017).

Figura 2.

Árbol filogenético resultante por Máxima Parsimonia y su relación con el complejo serológico de los Alphavirus



Nuestra hipótesis evolutiva de Alphavirus muestra que el complejo Semiliki Complex está conformado por ocho especies de virus: BEBV, CHIKV, MAYV, GETV, SFV, RRV, ONNV y UNAV, todos que han sido aislados en el Viejo Mundo excepto MAYV y UNAV que son los únicos que a pesar de pertenecer a dicho clado han sido aislados en el Nuevo mundo (Muñoz & Navarro, 2012). El complejo antigénico de Barmah Forest Virus está conformado por él mismo como su único miembro (Michie et al., 2020).

MATRIZ DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ALPHAVIRUS

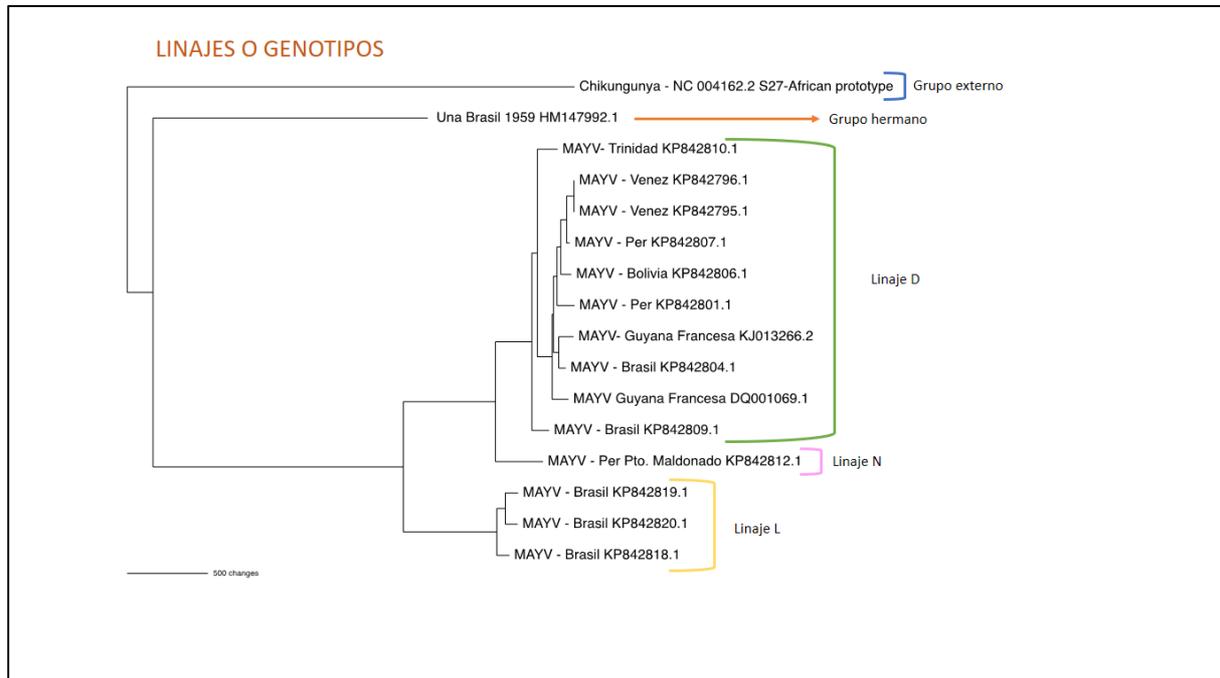
El siguiente clado que se identifica dos grupos hermanos y monofiléticos, El complejo de Encefalitis Equina del Este (EEEV) y el Complejo de Encefalitis Equina Venezolana (VEEV). El complejo de EEEV se divide en dos variantes, la de Norteamérica y Sudamérica, esta última denominada como Virus Madariaga (MDV) (Carrera et al., 2020) .

El complejo antigénico de VEEV se clasifica en seis subtipos, designados del I al VI, a saber: VEEV, TONV y MUCV, EVEV, PIXV, CABV y RNV, los mismos que pueden presentar subtipos por ejemplo IF que ahora se denomina Mosso das Pedras (Naomi L. Forrester et al., 2017).

Basado en diferencias genéticas, tal como lo describió Powers et.al (2001), el complejo del virus Trocara se muestra separado como una nueva especie de Alphavirus. El siguiente grupo de virus: TALV, MWAV y EILV es específico de insectos y constituye un grupo hermano y monofilético del complejo WEEV. Al igual que Hermanns et al. (2020) nuestro árbol muestra que ASALV, se encuentra apical en relación a TROCV, pero basal en relación a los otros virus insecto-específicos.

Los virus del complejo WEEV se muestran como un grupo monofilético que desciende de un ancestro común, los virus Babanki, Kyzylgach y WHAV están más estrechamente relacionados con el SINV mientras que AURAV está más distante en relación con el grupo, mientras que FMV, BCRV y HJV están más relacionados a WEEV (Powers et al., 2001).

MATRIZ DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ALPHAVIRUS

Figura 3.*Filogenia del Virus Mayaro (MAYV)*

El árbol filogenético de MAYV que se observa en la figura 3, también fue construido por el método de máxima parsimonia a partir del genoma completo del virus, este muestra un índice de retención (IR) de 0,23 y un índice de consistencia (IC) de 0,56.

Según algunos autores MAYV fue introducido en América hace aproximadamente 2.000 a 3.000 años producto de la divergencia entre los complejos Semliki y WEEV posiblemente debido a las aves migratorias y los humanos (Muñoz & Navarro, 2012).

Para formar la estructura filogenética se utilizó como grupo externo a CHIKV y como grupo hermano al UNAV, y se obtuvo tres linajes que corresponden al D donde se incluye el primer virus aislado en Trinidad, además de Venezuela, Perú, Bolivia, Guyana Francesa y Brasil; el linaje N que corresponde únicamente a Puerto Maldonado en el Perú, y finalmente el Linaje L que corresponde solamente a Brasil (Auguste et al., 2015).

MATRIZ DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ALPHAVIRUS

UNAV se considera grupo hermano de MAYV pues es la agrupación más parsimoniosa considerando que son únicas dentro del complejo Semiliki Forest y que su distribución geográfica es en el Nuevo Mundo (N. L. Forrester et al., 2012).

Discusión

Esta investigación describe las relaciones filogenéticas de los Alphavirus, algunos de los cuales producen patologías de importancia veterinaria y humana, y se hace énfasis en MAYV que ha producido brotes epidémicos en Centro y Sudamérica y, por lo tanto, se considera importante tener una matriz de identificación en caso de realizarse el diagnóstico molecular del mismo.

Como se muestra en la figura 1, SPDV y SDV son ubicados como grupos externos, ambos son acuáticos, lo cual podría implicar un origen de los Alphavirus en el Océano Pacífico en hospederos vertebrados marinos, que posteriormente pasaron a hospederos terrestres y a vectores de mosquitos (N. L. Forrester et al., 2012)

Los Alphavirus del Nuevo Mundo son más virulentos que los del Viejo Mundo, si se presume que la virulencia está relacionada con un tiempo de adaptación reciente, se podría sugerir que el contacto con las poblaciones humanas de América es de un tiempo menor. Además, esta hipótesis se apoya en que la distancia evolutiva entre los Alphavirus del Viejo Mundo es mayor que las del Nuevo Mundo (Lavergne et al., 2006).

Dentro del complejo Semiliki Forest, la relación de grupos hermanos entre UNAV y MAYV sugiere que un ancestro común fue transportado al Nuevo Mundo en un pasado lejano (Auguste et al. 2017) (Weaver, Winegar, Manger, & Forrester, 2012).

Se ha utilizado estudios filogenéticos para explicar los patrones de dispersión del EEEV, las cepas de Norteamérica están muy conservadas genéticamente y tienen un único linaje desde aproximadamente 80 años cuando se aisló en 1933; por el contrario en las cepas de Sudamérica la diversidad genética se atribuye a su circulación entre hospederos y

MATRIZ DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ALPHAVIRUS

vectores con limitada dispersión, hospederos enzoóticos como mamíferos pequeños, por el contrario lo Alphavirus aviares entre los que se encuentran SINV, EEEV y WEEV muestran menor diversidad genética posiblemente porque se dispersan por amplias regiones geográficas promoviendo la selectividad de variantes más aptas (Scott C. Weaver et al., 2012).

Existe un grupo de Alphavirus que no infecta vertebrados (virus insecto-específicos) y ha sido detectado en mosquitos del Viejo Mundo, son todos de un grupo hermano monofilético del clado de WEE y está constituido por EILV, TALV y MWAV; mientras que el ASALV se considera una nueva especie de virus en el Nuevo Mundo y es insecto-específico, es decir que no tiene hospederos mamíferos, y se diferencia del complejo WEE por su susceptibilidad a las temperaturas superiores a 31 °C (Hermanns et al., 2020).

Por otro lado, el mecanismo de recombinación ha favorecido la diversificación y evolución de los virus ARN dando lugar a nuevos géneros, especies e incluso familias donde se incluyen los ancestros quiméricos de los Alphavirus (Mavian et al., 2017). Los procesos de recombinación permiten a los virus adquirir, en un solo paso, mutaciones adaptativas clave que mejoran su aptitud, tropismo o virulencia (Mavian et al., 2017); es así que el WEEV es un Alphavirus recombinante descendiente de ancestros similares al Sindbis y al EEEV (Navarro, Juan-Carlos, Carrera, Jean-Paul, Liria & Auguste, 2017). Investigaciones han revelado que sus genes no estructurales y los de la cápside tienen mayor similitud con el EEEV mientras que aquellos vinculados con las glicoproteínas de envoltura se asemejan más a los del SINV (Scott C. Weaver et al., 2012).

Región geográfica de los Alphavirus

El paso del Viejo Mundo al Nuevo Mundo de los Alphavirus o viceversa requiere múltiples reintroducciones en ambos sentidos para explicar su amplia distribución geográfica; sin embargo, otra explicación podría ser su emergencia desde vertebrados marinos y luego su aparición en hospederos terrestres, su movilidad al este y oeste daría lugar a los ancestros del

MATRIZ DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ALPHAVIRUS

Viejo y el Nuevo Mundo también con posteriores reintroducciones entre los hemisferios (N. L. Forrester et al., 2012).

En la figura 4, podemos ver la distribución geográfica de los complejos de Alphavirus. La EEEV circula a lo largo de la costa este de Norteamérica y algunas cepas se encuentran en el norte de México y el Caribe y produce ciclos enzoóticos en aves, pero también circula en Sudamérica, donde ha desarrollado su propio perfil genético que lo diferencia del de Norteamérica y se le considera una nueva especie llamada virus Madariaga (MADV) debido a su primera caracterización en Argentina (Navarro, Juan-Carlos, Carrera, Jean-Paul, Liria & Auguste, 2017).

La VEE es una enfermedad emergente y endémica que circula entre roedores y mosquitos silvestres pero, la introducción de caballos en el período colonial hizo de ellos un nuevo hospedero en las Américas, que desencadenó brotes en estos animales y aumentó la exposición de los seres humanos. Los virus de complejo VEE circulan por América Central y del Sur excepto el subtipo II que solo se encuentra en Florida (Navarro, Juan-Carlos, Carrera, Jean-Paul, Liria & Auguste, 2017).

Los virus EILV, TALV y MWAV forman un grupo monofilético que se encuentra en el Viejo Mundo, a diferencia de ASALV que es el único que se encuentra en Panamá (Hermanns et al., 2020), lo que sugiere la presencia de virus insecto específicos en ambas partes del mundo. Todavía es muy incipiente el conocimiento y diversidad de estos virus, lo que pueda dar muchas pistas de la evolución de los Alphavirus a medida que se detecten un mayor número de ellos. Adicionalmente tiene una importancia fundamental en la investigación y desarrollo de vacunas contra los Alphavirus debido a la incapacidad de replicarse en células de vertebrados (Carvalho et al., 2021).

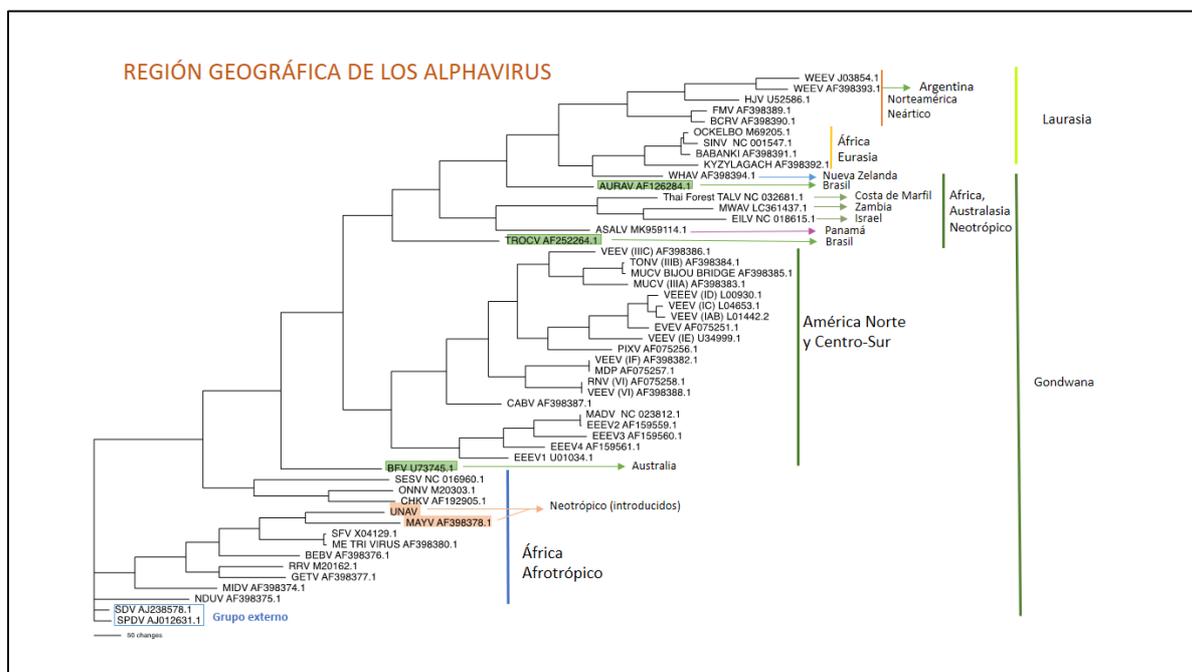
El complejo de virus similares a Sindbis se encuentra dividido, FMV, BCRV y HJV y la cepa AF398393 de Argentina se encuentran en el Nuevo Mundo, mientras que Sindbis,

MATRIZ DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ALPHAVIRUS

Babanki, Ockelbo, Kyzylgach y Whataroa se encuentran en el Viejo Mundo (S C Weaver et al., 1997).

Figura 4.

Distribución geográfica de los Alphavirus

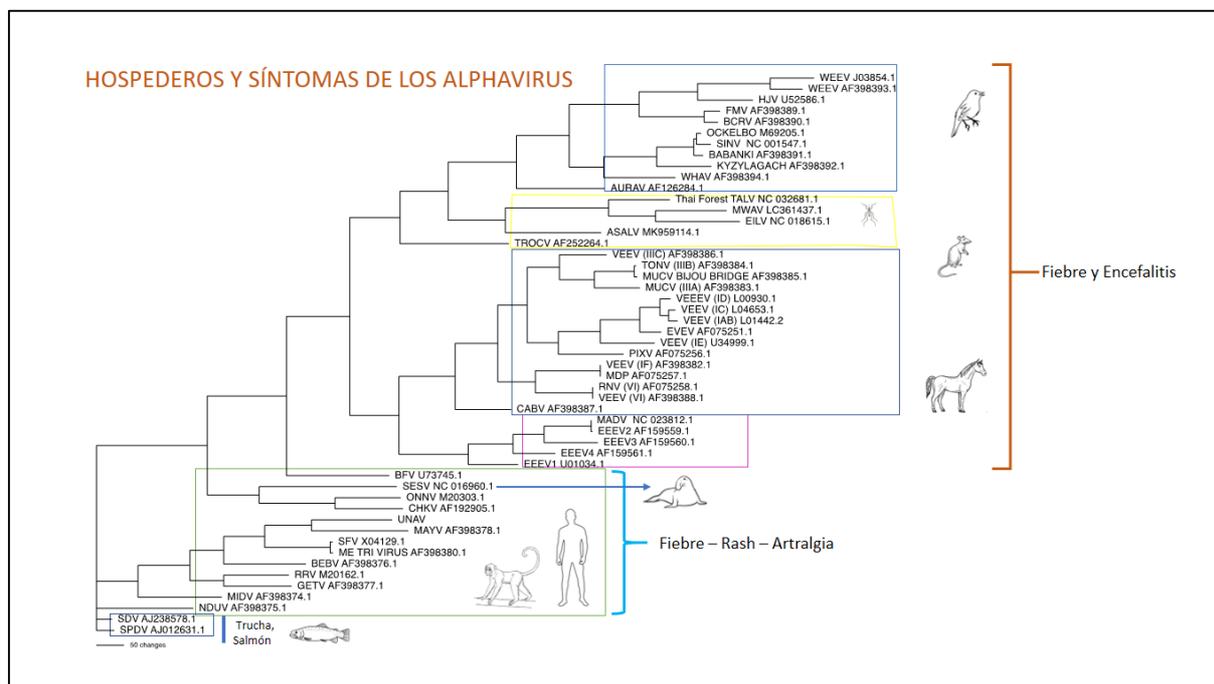


Hospedadores y Síntomas

Como podemos observar en la figura 5, los Alphavirus están presentes en diversos hospederos que incluyen peces, mamíferos incluido el humano, aves, insectos y peces (Hermanns et al., 2020). Los virus acuáticos son el SPDV que afecta al salmón y su subtipo el SDV que afecta a la trucha producen grandes pérdidas en los criaderos de estos peces, su vector es el “piojo de del salmón” *Lepeophtheirus salmonus*. Los virus terrestres provocan enfermedad aguda con fiebre y pueden ser divididos en dos grandes grupos los que además presentan encefalitis localizados principalmente en el Nuevo Mundo y los que provocan artralgia y erupción en la piel, presentes especialmente en el Viejo Mundo. Es importante mencionar que muchos Alphavirus que permanecen en ciclos enzoóticos, no producen enfermedad (N. L. Forrester et al., 2012).

MATRIZ DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ALPHAVIRUS

Figura 5.

Hospedadores y Síntomas de los Alphavirus

En la figura 5, podemos ver los hospederos de Alphavirus y su relación monofilética de acuerdo a la patología que causan. Dentro del grupo de Semliki forest el virus Chikungunya es el que ha causado mayor enfermedad en millones de personas en África, Europa, Asia y América, pues es el único que utiliza al humano como reservorio y es transmitido en un ciclo urbano (Azar et al., 2020).

La infección por MAVY tal como se mencionó anteriormente produce fiebre, artralgia y una erupción cutánea, a veces también asociados a cefalea, mialgia, dolor retro-ocular, vómito y diarrea (Lorenz et al., 2019). UNAV ha sido aislado en aves, humanos e insectos pero el riesgo de enfermedad en los humanos no es muy conocida (Powers et al., 2006).

El complejo EEEV afecta equinos, reptiles, humanos y aves, estas últimas sirven de hospedero y reservorio pues el vector *Cs. melanura* se conoce por ser ornitofílico; y al igual que el VEEV afecta principalmente a equinos los cuales padecen fiebre, inapetencia, letargo, taquicardia y con frecuencia la enfermedad suele ser fatal. En los humanos, al inicio los

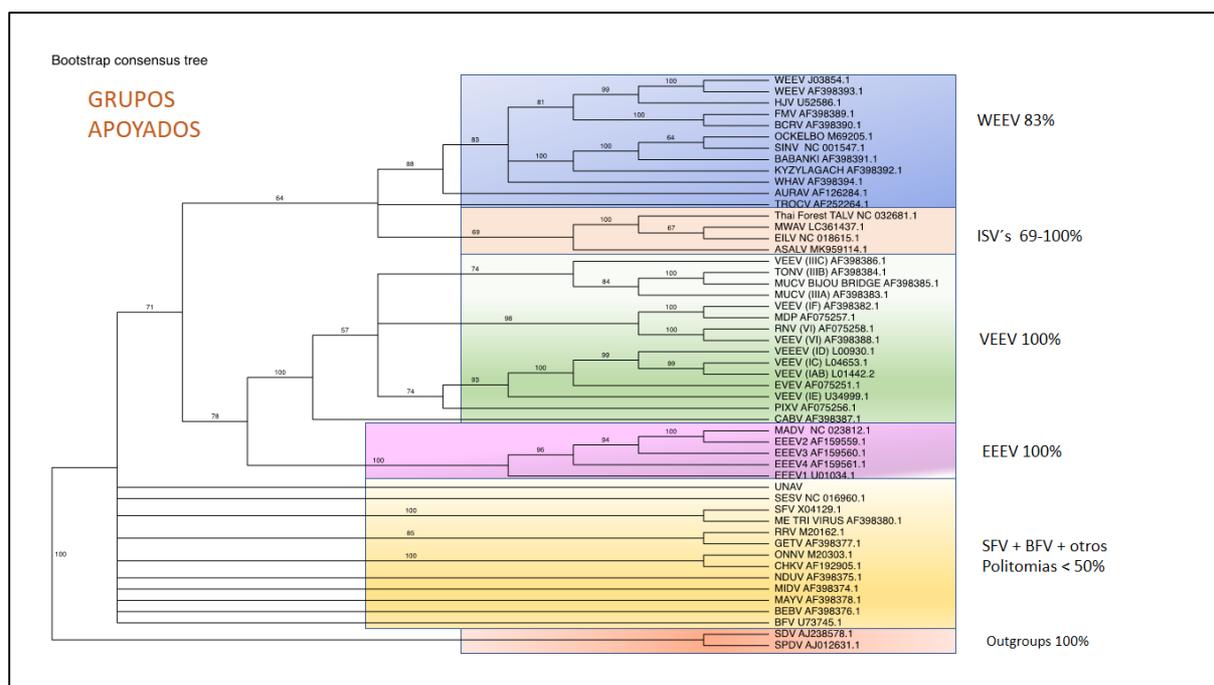
MATRIZ DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ALPHAVIRUS

síntomas son los mismos descritos anteriormente, pero un 4-14% de casos progresan a encefalitis con confusión, fotofobia, alteración de la conciencia entre otros síntomas, a veces la enfermedad puede dejar secuelas neurológicas (Azar et al., 2020).

La encefalitis equina del oeste es generalmente más severa en equinos que en humanos, provoca fiebre, irritabilidad, caída de la cabeza, ceguera, movimientos involuntarios y coma; mientras tanto en los humanos puede pasar desde una enfermedad subclínica con fiebre o llegar hasta encefalitis. Sin embargo, dentro de este grupo, el virus Sindbis produce solamente el cuadro de fiebre y artralgia (Azar et al., 2020).

Figura 6.

Árbol de consenso con los grupos apoyados de Alphavirus



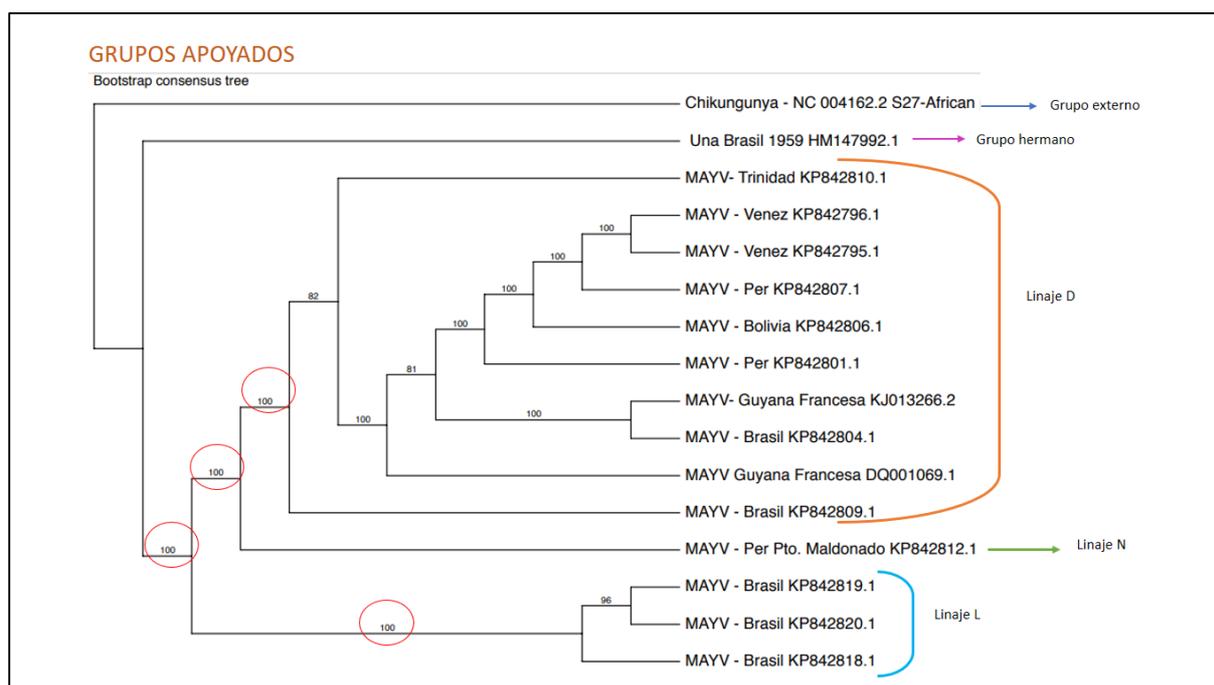
En la figura 6, se observa el apoyo de grupos o clados calculado mediante un análisis estadístico de bootstrap con 500 pseudoréplicas, cada color muestra un clado apoyado, aquellos con mayor sinapomorfías son los virus de encefalitis equina del este y de Venezuela con un 100%; mientras que los virus de encefalitis del este solo muestran un 83%, lo cual se apoya en que este grupo es producto de la recombinación de los virus Sindbis y EEEV. En el

MATRIZ DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ALPHAVIRUS

clado de color amarillo se unen varios complejos serológicos y se muestra un porcentaje de apoyo de solo 50% con una politomía que nos indica que no se encuentra exactamente resuelto el grado de ancestralidad entre los grupos. Finalmente, el grupo externo muestra un porcentaje de bootstrap del 100%, ambos son virus acuáticos ancestrales de los Alphavirus.

Figura 7.

Árbol de consenso de MAYV



La figura 7, muestra los linajes de MAYV de acuerdo con el análisis estadístico de bootstrap realizado con 500 pseudoréplicas.

MAYV tiene tres linajes o genotipos D, L y N que están muy conservados genéticamente, con una divergencia de nucleótidos de aproximadamente 17% entre los tres. Dentro del genotipo D se encuentra una variación de un 4%, se sugieren que los genotipos D y L divergieron hace ≈ 150 años y que el genotipo N divergió hace ≈ 250 años (Auguste et al., 2015).

MATRIZ DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ALPHAVIRUS

Conclusiones

El mapeo filogenético de los Alphavirus nos ha permitido distinguir su clasificación en clados que coinciden con los complejos serológicos.

El uso de la proteína E1 dado que contiene más sitios conservados permitió alinear a los Alphavirus sin tener que recurrir a todo el genoma y construir árboles filogenéticos confiables de acuerdo a los valores de bootstrap.

Se mostró la gran distribución geográfica de los Alphavirus en el mundo, y se muestra la importancia del hospedador/reservorio en la divergencia entre clados y dentro de cada clado.

La distancia evolutiva entre los Alphavirus del Viejo Mundo es mayor que las del Nuevo Mundo y ello apoya un posible tiempo de adaptación reciente en contacto con los humanos y con ello mayor severidad en los síntomas.

MAYV es endémico en Sudamérica y se presume que circula en Ecuador por la presencia de anticuerpos, de ahí que es necesario tener una plataforma de identificación molecular para Alphavirus y para Mayaro en caso de realizarse un diagnóstico molecular, esto nos permitiría realizar una identificación rápida de cualquier Alphavirus, incluyendo nuevas introducciones sin tener que recurrir a entidades internacionales.

La ubicación filogenética de los alphavirus insecto específicos muestra que posibles análisis futuros serán fundamentales en la investigación y desarrollo de vacunas contra los Alphavirus debido a su no replicación en células de vertebrados, pero que activan la producción de anticuerpos contra epítopos de los alpha patógenos de los mismos.

Agradecimientos

MATRIZ DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ALPHAVIRUS

Universidad Internacional SEK y a su cuerpo docente por el apoyo para el desarrollo de este trabajo de investigación y por los conocimientos brindados en el desarrollo de esta Maestría en Biomedicina que ha sido un ansiado anhelo personal.

Referencias Bibliográficas

- Acosta-Ampudia, Y., Monsalve, D. M., Rodríguez, Y., Pacheco, Y., Anaya, J. M., & Ramírez-Santana, C. (2018). Mayaro: an emerging viral threat? In *Emerging Microbes and Infections* (Vol. 7, Issue 1). Nature Publishing Group.
<https://doi.org/10.1038/s41426-018-0163-5>
- Auguste, A. J. A. J., Liria, J., Forrester, N. L. N. L., Giambalvo, D., Moncada, M., Long, K. C. K. C., Morón, D., de Manzione, N., Tesh, R. B., Halsey, E. S. E. S., Kochel, T. J. T. J. T. J., Hernandez, R., Navarro, J.-C. J., Weaver, S. C. S. C., Manzione, N. de, Tesh, R. B., Halsey, E. S. E. S., Kochel, T. J. T. J. T. J., Hernandez, R., ... Weaver, S. C. S. C. (2015). Evolutionary and Ecological Characterization of Mayaro Virus Strains Isolated during an Outbreak, Venezuela, 2010. *Emerging Infectious Diseases*, *21*(10), 1742–1750. <https://doi.org/10.3201/eid2110.141660>
- Azar, S. R., Campos, R. K., Bergren, N. A., Camargos, V. N., & Rossi, S. L. (2020). Epidemic alphaviruses: Ecology, emergence and outbreaks. *Microorganisms*, *8*(8), 1–35.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8081167>
- Blohm, G., Elbadry, M. A., Mavian, C., Stephenson, C., Loeb, J., White, S., Telisma, T., Chavannes, S., Beau De Rochar, V. M., Salemi, M., Lednicky, J. A., & Morris, J. G. (2019). Mayaro as a Caribbean traveler: Evidence for multiple introductions and transmission of the virus into Haiti. *International Journal of Infectious Diseases*, *87*, 151–153. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.07.031>

MATRIZ DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ALPHAVIRUS

- Carrera, J.-P., Cucunubá, Z. M., Neira, K., Lambert, B., Pittí, Y., Liscano, J., Garzón, J. L., Beltran, D., Collado-Mariscal, L., Saenz, L., Sosa, N., Rodriguez-Guzman, L. D., González, P., Lezcano, A. G., Pereyra-Elías, R., Valderrama, A., Weaver, S. C., Vittor, A. Y., Armien, B., ... Donnelly, C. A. (2020). Endemic and Epidemic Human Alphavirus Infections in Eastern Panama: An Analysis of Population-Based Cross-Sectional Surveys. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(6), 2429. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.20-0408>
- Carvalho, V. L., Long, M. T., & Rua-Uribe, G. (2021). *Perspectives on New Vaccines against Arboviruses Using Insect-Specific Viruses as Platforms*. <https://doi.org/10.3390/vaccines9030263>
- Forrester, N. L., Palacios, G., Tesh, R. B., Savji, N., Guzman, H., Sherman, M., Weaver, S. C., & Lipkin, W. I. (2012). Genome-Scale Phylogeny of the Alphavirus Genus Suggests a Marine Origin. *Journal of Virology*, 86(5), 2729. <https://doi.org/10.1128/JVI.05591-11>
- Forrester, Naomi L., Wertheim, J. O., Dugan, V. G., Auguste, A. J., Lin, D., Adams, A. P., Chen, R., Gorchakov, R., Leal, G., Estrada-Franco, J. G., Pandya, J., Halpin, R. A., Hari, K., Jain, R., Stockwell, T. B., Das, S. R., Wentworth, D. E., Smith, M. D., Pond, S. L. K., & Weaver, S. C. (2017). Evolution and spread of Venezuelan equine encephalitis complex alphavirus in the Americas. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(8), e0005693. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0005693>
- Ganjan, N., & Riviere-Cinnamond, A. (2020). Mayaro virus in Latin America and the Caribbean. *Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health*, 44, 1–11. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.14>
- Hermanns, K., Marklewitz, M., Zirkel, F., Overheul, G. J., Page, R. A., Loaiza, J. R., Drosten, C., Van Rij, R. P., & Junglen, S. (2020). Agua salud alphavirus defines a novel lineage of insect-specific alphaviruses discovered in the New World. *Journal of General*

MATRIZ DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ALPHAVIRUS

- Virology*, 101(1), 96–104. <https://doi.org/10.1099/JGV.0.001344>
- Izurieta, R. O., MacAluso, M., Watts, D. M., Tesh, R. B., Guerra, B., Cruz, L. M., Galwankar, S., & Vermund, S. H. (2011). Hunting in the rainforest and mayaro virus infection: An emerging alphavirus in Ecuador. *Journal of Global Infectious Diseases*, 3(4), 317–323. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.91049>
- Lavergne, A., Thoisy, B. de, Lacoste, V., Pascalis, H., Pouliquen, J. F., Mercier, V., Tolou, H., Dussart, P., Morvan, J., Talarmin, A., & Kazanji, M. (2006). Mayaro virus: Complete nucleotide sequence and phylogenetic relationships with other alphaviruses. *Virus Research*, 117(2), 283–290. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.11.006>
- Lorenz, C., Freitas Ribeiro, A., & Chiaravalloti-Neto, F. (2019). Mayaro virus distribution in South America. *Acta Tropica*, 198(July), 105093. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105093>
- Mavian, C., Rife, B. D., Dollar, J. J., Cella, E., Ciccozzi, M., Prosperi, M. C. F., Lednicky, J., Morris, J. G., Capua, I., & Salemi, M. (2017). Emergence of recombinant Mayaro virus strains from the Amazon basin. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07152-5>
- Michie, A., Ernst, T., Chua, I.-L. J., Lindsay, M. D. A., Neville, P. J., Nicholson, J., Jardine, A., Mackenzie, J. S., Smith, D. W., & Imrie, A. (2020). *Phylogenetic and Timescale Analysis of Barmah Forest Virus as Inferred from Genome Sequence Analysis*. www.mdpi.com/journal/viruses
- Muñoz, M., & Navarro, J. C. (2012). Virus Mayaro: Un arbovirus reemergente en Venezuela y Latinoamérica. *Biomedica*, 32(2), 286–302. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v32i2.647>
- Navarro, Juan-Carlos, Carrera, Jean-Paul, Liria, J., & Auguste, A. J. and W. S. C. (2017). Alphaviruses in Latin America and the Introduction of Chikungunya Virus. In *Human*

MATRIZ DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ALPHAVIRUS

Virology in Latin America: From Biology to Control (pp. 169–192).

<https://doi.org/10.1007/978-3-319-54567-7>

- Pietilä, M. K., Hellström, K., & Ahola, T. (2017). Alphavirus polymerase and RNA replication. *Virus Research*, 234, 44–57. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.01.007>
- Powers, A. M., Aguilar, P. V., Chandler, L. J., Brault, A. C., Meakins, T. A., Watts, D., Russell, K. L., Olson, J., Vasconcelos, P. F. C., Da Rosa, A. T., Weaver, S. C., & Tesh, R. B. (2006). Genetic relationships among Mayaro and Una viruses suggest distinct patterns of transmission. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(3), 461–469. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2006.75.461>
- Powers, A. M., Brault, A. C., Shirako, Y., Strauss, E. G., Kang, W., Strauss, J. H., & Weaver, S. C. (2001). Evolutionary Relationships and Systematics of the Alphaviruses. *Journal of Virology*, 75(21), 10118–10131. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.21.10118-10131.2001>
- Weaver, S C, Kang, W., Shirako, Y., Rumenapf, T., Strauss, E. G., & Strauss, J. H. (1997). Recombinational history and molecular evolution of western equine encephalomyelitis complex alphaviruses. *Journal of Virology*, 71(1), 613–623. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.1.613-623.1997>
- Weaver, Scott C., Winegar, R., Manger, I. D., & Forrester, N. L. (2012). Alphaviruses: Population genetics and determinants of emergence. *Antiviral Research*, 94(3), 242. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2012.04.002>