



CENUR
Litoral Norte
Salto



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

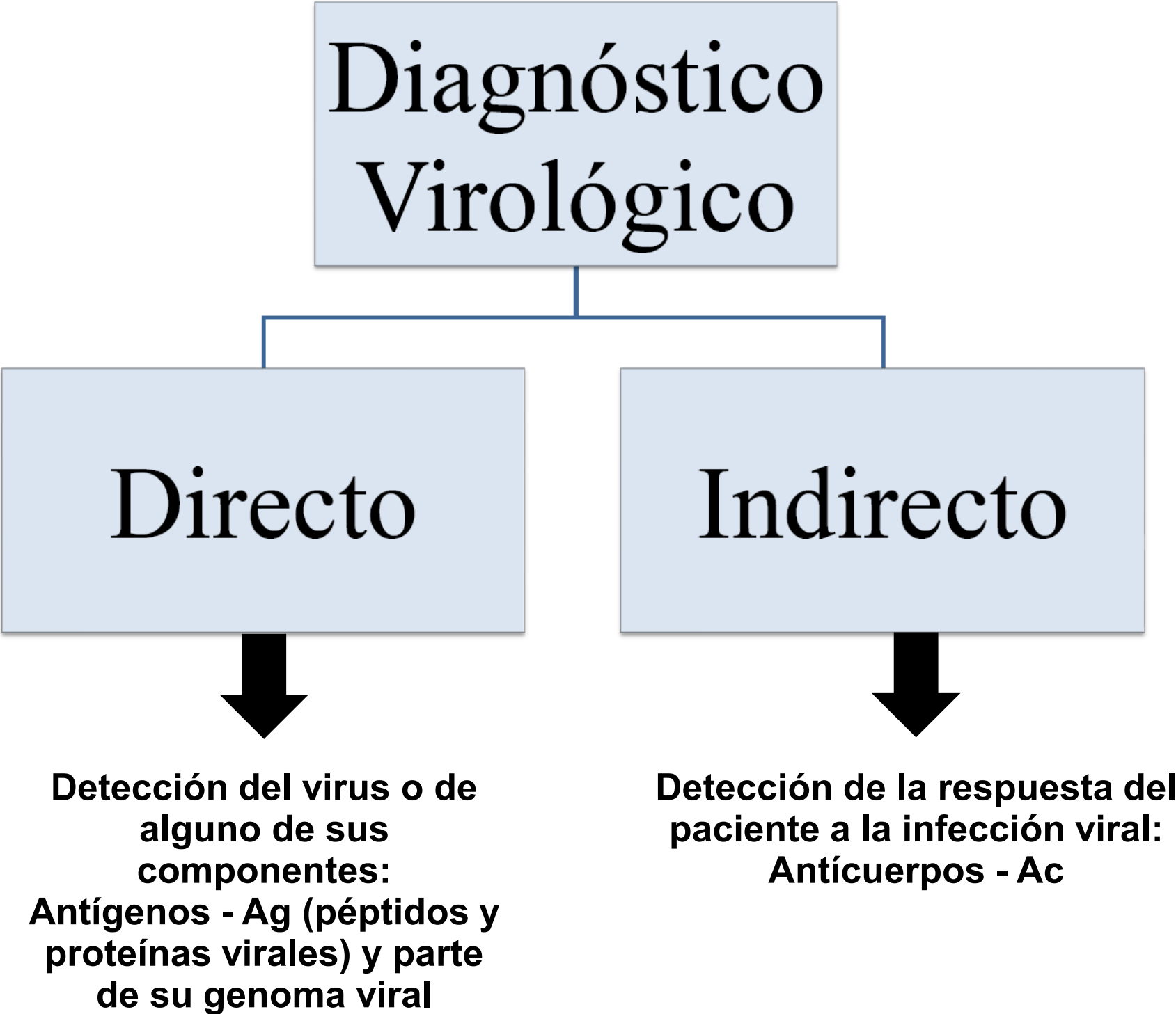
Técnicas moleculares aplicadas a virología

Rodney Colina

Laboratorio de Virología Molecular.

CENUR Litoral Norte, Sede Salto, UdelaR.

Diagnóstico Viroológico



```
graph TD; A[Diagnóstico Viroológico] --> B[Directo]; A --> C[Indirecto]; B --> D["Detección del virus o de alguno de sus componentes:  
Antígenos - Ag (péptidos y proteínas virales) y parte de su genoma viral"]; C --> E["Detección de la respuesta del paciente a la infección viral:  
Anticuerpos - Ac"];
```

Directo

**Detección del virus o de alguno de sus componentes:
Antígenos - Ag (péptidos y proteínas virales) y parte de su genoma viral**

Indirecto

**Detección de la respuesta del paciente a la infección viral:
Anticuerpos - Ac**

Estrategias Generales para el Diagnóstico de Laboratorio de las Infecciones Virales

■ Detección Directa

- ☐ Microscopia
- ☐ Aislamiento Viral
- ☐ Detección de antígenos virales
- ☐ Detección del material genómico (ADN o ARN)

■ Detección Indirecta

- ☐ Anticuerpos específicos

TÉCNICAS MOLECULARES



GENERALIDADES:

- ➔ **Detectan específicamente ácidos nucleicos** (Virus, Bact., Parast., etc).
- ➔ No requieren virus infectivos.
- ➔ Pueden realizarse a partir de diferentes tipos de muestras clínicas.
- ➔ Son muy sensibles y específicas.
- ➔ Alta reproductibilidad.
- ➔ Pueden ser complementaria a otras técnicas de identificación viral (ECP).

TÉCNICAS MOLECULARES

Detección del ácido nucleico sin amplificación (Ej: Rotavirus)



Detección a partir de la amplificación del ADN (*PCR & Electroforesis / qPCR*)

Secuenciación
De ADN
(*Met. de Sanger,*
NGS)

Hibridación de los
Ácidos Nucleicos
(*Southern blot: ADN*)
(*Nouthern blot: ARN*)

Polimorfismo en
Fragmentos de
Restricción
(*RFLP*)

TÉCNICAS MOLECULARES

APLICACIONES:

➡ Diagnóstico

➡ Investigación:

- Caracterización genética**
- Identificación de mutaciones**
- Estudios de epidemiología molecular**

TÉCNICAS MOLECULARES

MUESTRAS:

➡ sangre

➡ suero

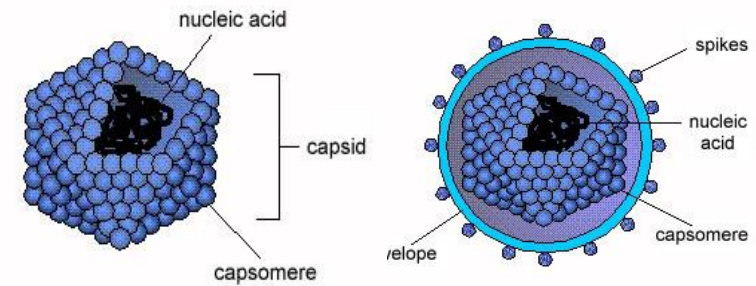
➡ semen

➡ tejidos

➡ secreciones

➡ materia fecal

TÉCNICAS MOLECULARES



Extracción del ácido nucleico

FUNDAMENTO:

- ➡ Liberación del ácido nucleico de las estructuras que lo contienen:
cápside / core + cápside, core / capsid + envoltura lipídica

METODOLOGÍA:

- ➡ Existen muchos métodos caseros y también kits comerciales.
- ➡ El método dependerá:
 - del blanco a ser amplificado: ARN/ADN.
 - del tipo de muestra de partida: con o sin células, tejido, sangre/suero, materia fecal, etc.

TÉCNICAS MOLECULARES

Extracción del ácido nucleico

➤ **Método de Boom (sílice)**

➤ **Kit Qiagen - QIAamp Viral RNA**

AMBOS METODOS SE BASAN EN:

- Propiedad del agente caotrópico **ISOTIOSIANATO DE GUANIDINA**: lisis celular, desnaturalización de proteínas – disgregando la capsida viral e inhibiendo las ARNsas y ADNsas celulares presentes en la muestra.
- Propiedad de la **SÍLICE**: de unirse específicamente al ácido nucleico (ARN y ADN)

TÉCNICAS MOLECULARES

Extracción del ácido nucleico

QIAGEN: QIAamp Viral RNA Kit

Muestra



Lisis



Unión



Lavado 1



Lavado 2



Elución



Obtención de ácido
nucleico viral puro

QIAamp Viral RNA
Mini Spin Procedure

PCR

Reaccion en cadena de la polimerasa

Polimerase Chain Reaction - PCR

FUNDAMENTO:

Se basa en la amplificación exponencial *in vitro* de un fragmento de ADN (secuencia blanco o molde) presente en una muestra, por acción de una ADN polimerasa termoestable en condiciones controladas.



Kary Mullis



Thermophilus aquaticus

Amplificación:

La PCR permite obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia del ADN molde.

Parque Nacional Yellowstone



*Thermophilu **aq**uaticus*

Taq ADN Polimerasa:

Termoestabilidad: vida media a 95°C es de 40 minutos
Temperatura óptima de funcionamiento de 72 °C

PCR: Polymerase Chain Reaction

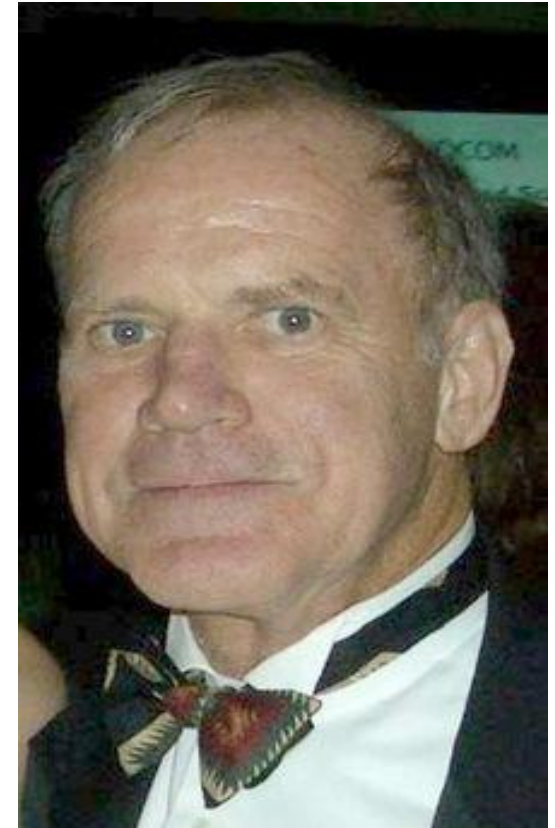


The Nobel Prize in Chemistry 1993

"for contributions to the developments of methods within DNA-based chemistry"

"for his invention of the polymerase chain reaction (PCR) method"

"for his fundamental contributions to the establishment of oligonucleotide-based, site-directed mutagenesis and its development for protein studies"



Kary Mullis

PCR “descubierta y desarrollada” en 1983

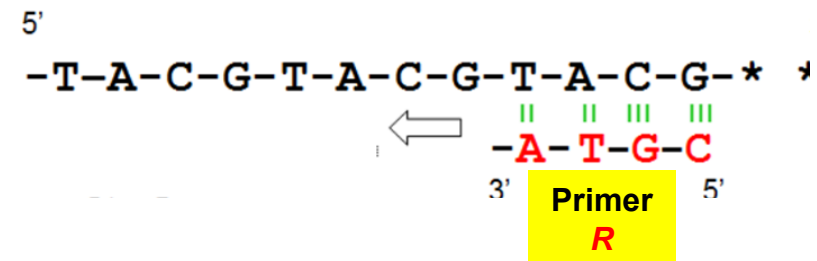
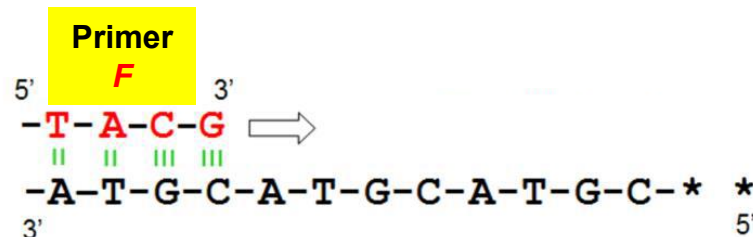
Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 1987;155:335-50.

Cualquier secuencia de ADN puede ser amplificada por PCR!

PRIMERS O CEBADORES

Oligonucleotidos: fragmentos cortos de ADN

- ➔ Se utiliza un par de cebadores (Sentido o *Forward* & Antisentido o *Reverse*).
- ➔ Se hibridizan en los extremos de la secuencia blanco.
- ➔ Se diseñan específicamente para cada ensayo (*softwares* específicos: Primer3).
- ➔ Longitud: 18 –30 pb.



PCR se realiza mediante ciclos de temperatura en un equipo llamado Termociclador



Ciclos de la PCR - Cada ciclo consta de 3 etapas:

➔ Desnaturalización (94-96°C):

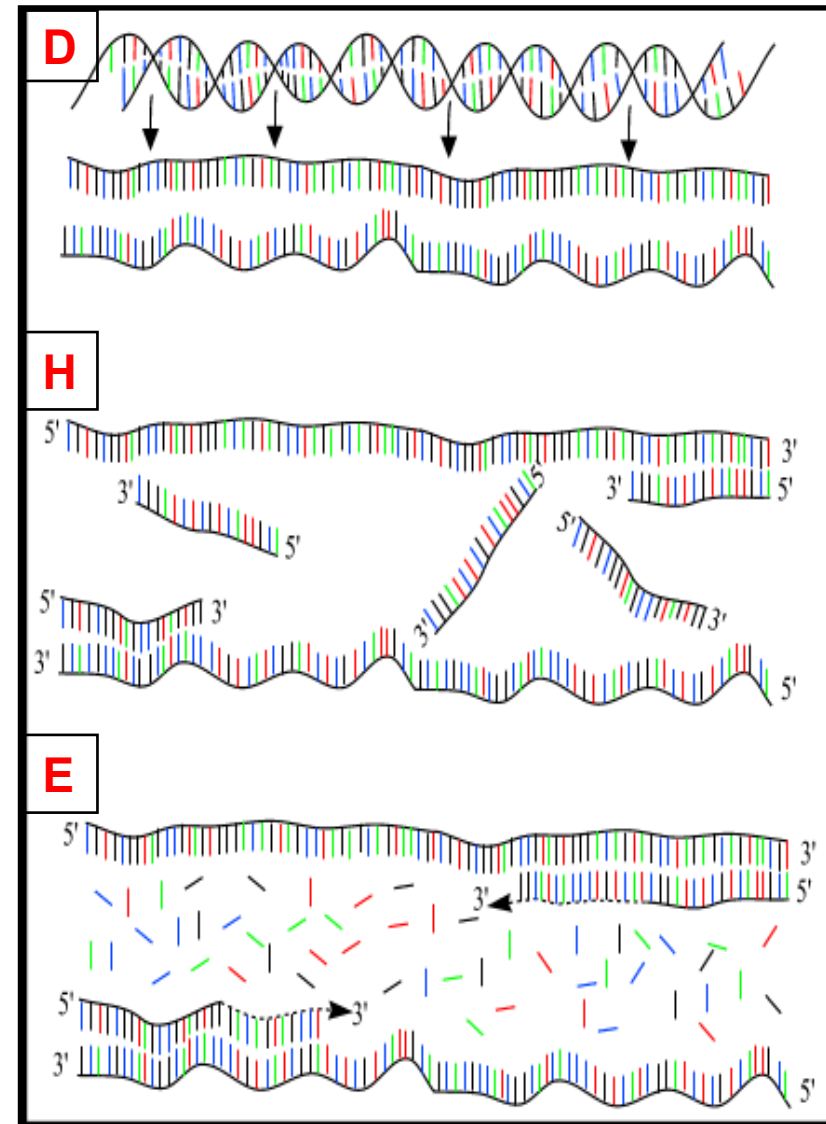
Separa la doble hebra del ADN molde en dos hebras simples.

➔ Hibridación (55-65°C):

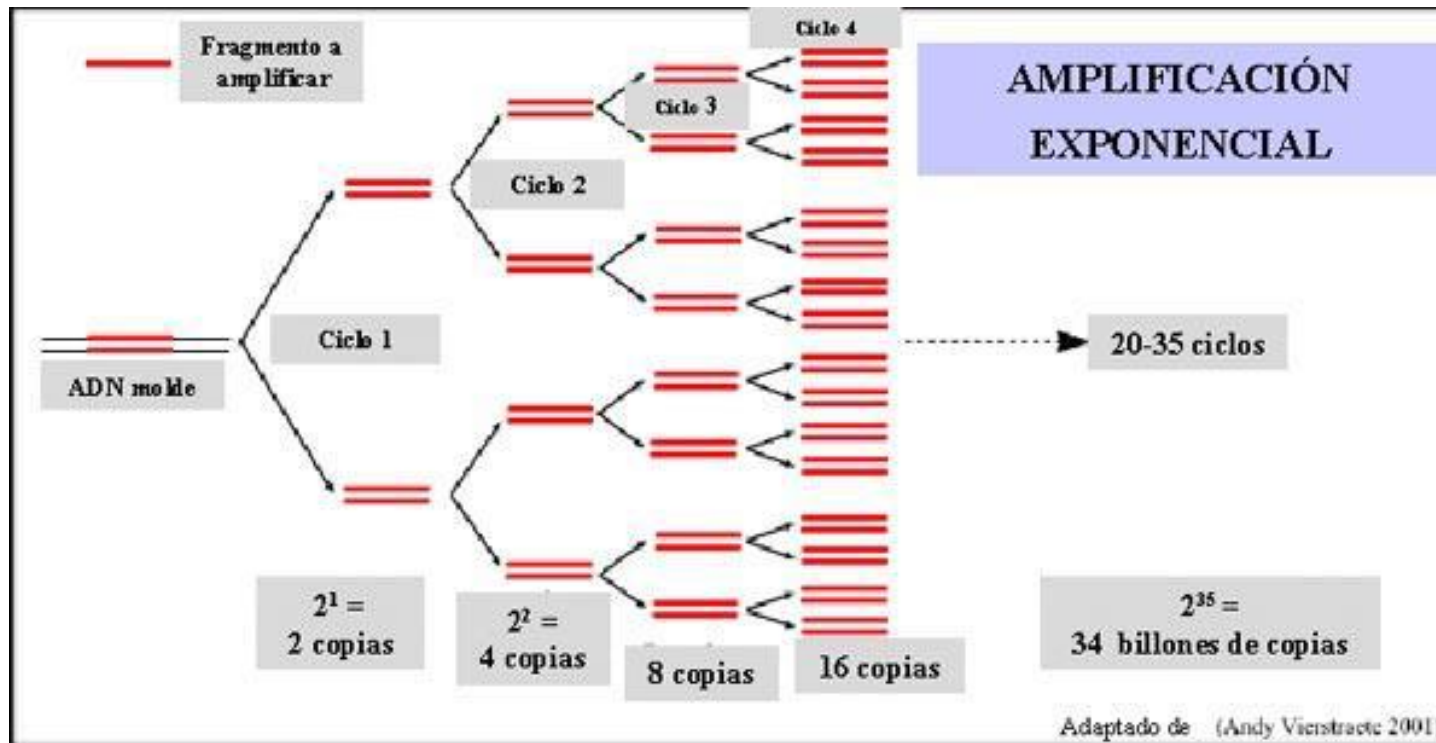
Permite el apareamiento de bases entre los *primers* y sus sitios específicos de unión en cada una de la hebras simples de ADN.

➔ Extensión o elongación (72°C)

Permite la polimerización del ADN a partir de los *primers*, formando dos dobles hebras.

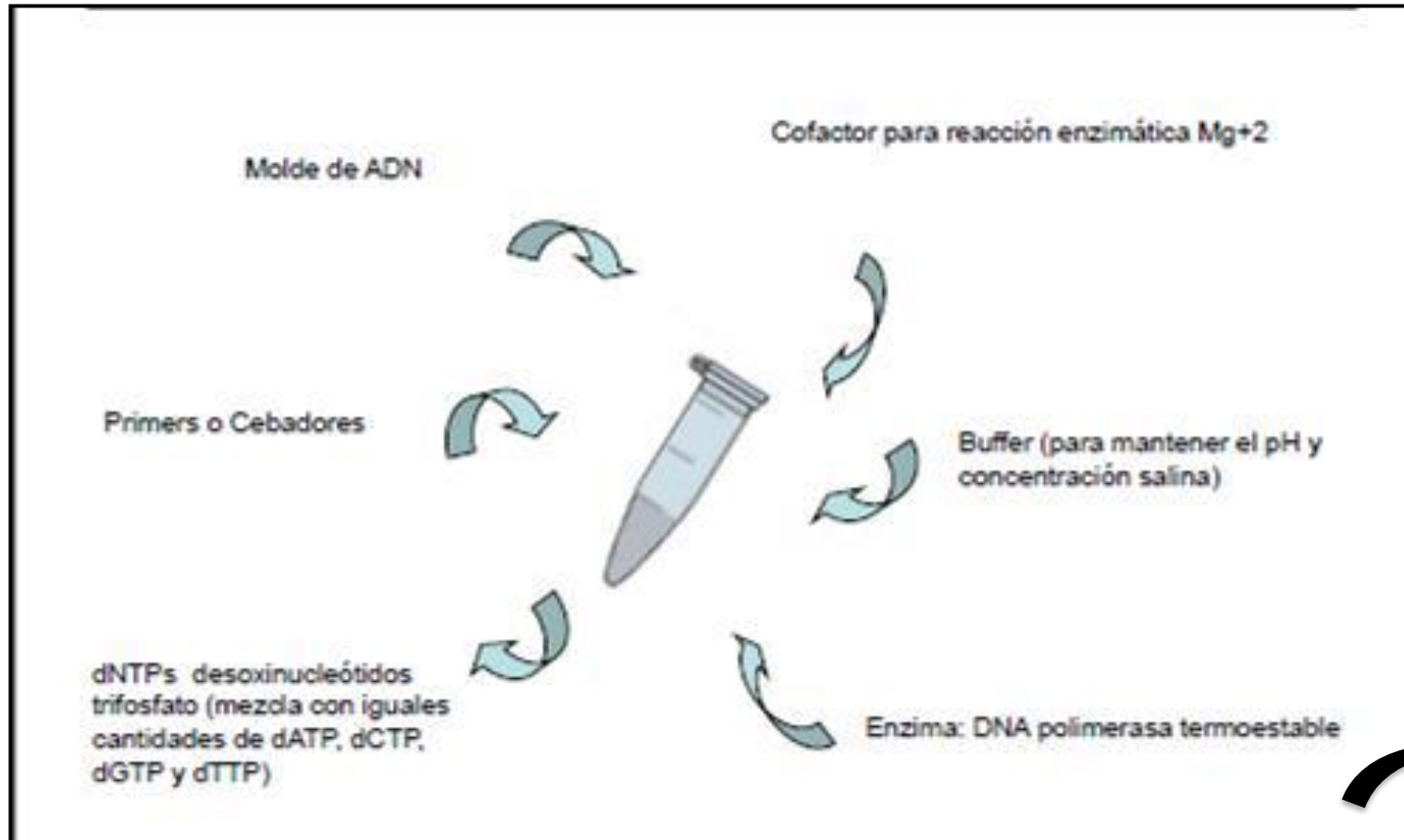


DESPUÉS DE SUCESIVOS CICLOS...



nº de ciclos	nº de copias por molde
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
20	1,048,576
30	1,073,741,824

Componentes de la PCR – preparación de la *Mix*



A PARTIR DEL PRODUCTO DE PCR:

➔ ELECTROFORESIS en GEL

➔ SECUENCIACIÓN de ADN

➔ DIGESTIÓN ENZ. RESTRICCIÓN (RFLP)

➔ HIBRIDACIÓN de los ÁCIDOS NUCLEICOS

Video explicativo de la PCR:

<http://www.youtube.com/watch?v=TalHTjA5gKU>

ELECTROFORESIS

Fundamento: Separación de proteínas o ácidos nucleicos (ADN o ARN) en un medio de soporte (gel). Para ello se someten las moléculas que están inmersas en el gel a la fuerza de un campo eléctrico.

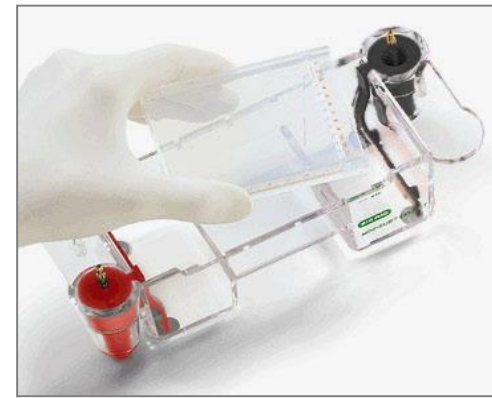
Electroforesis de ADN

Objetivo: *Visualización del ADN para determinar su tamaño en pares de bases (producto de la PCR).*

- ➡ Las moléculas migran según tamaño (pb).
- ➡ El gel se tiñe con una sustancia (Bromuro de Etídio, GoodView®) que luego se irradia con luz UV, para su visualización.

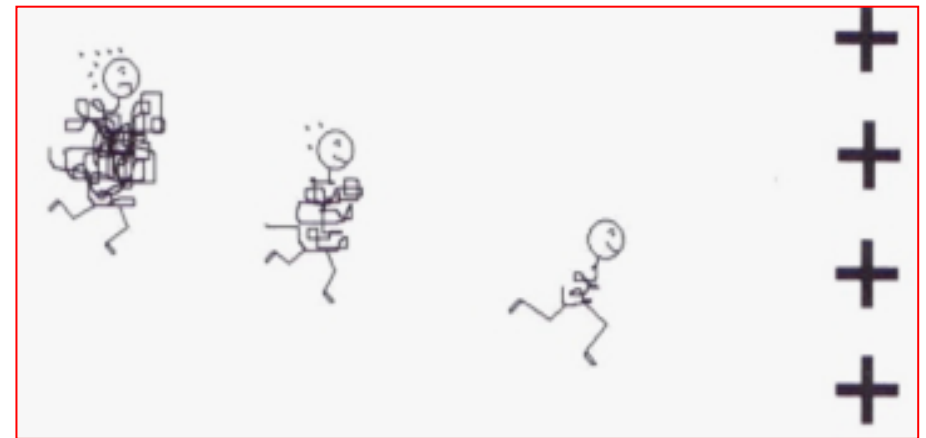
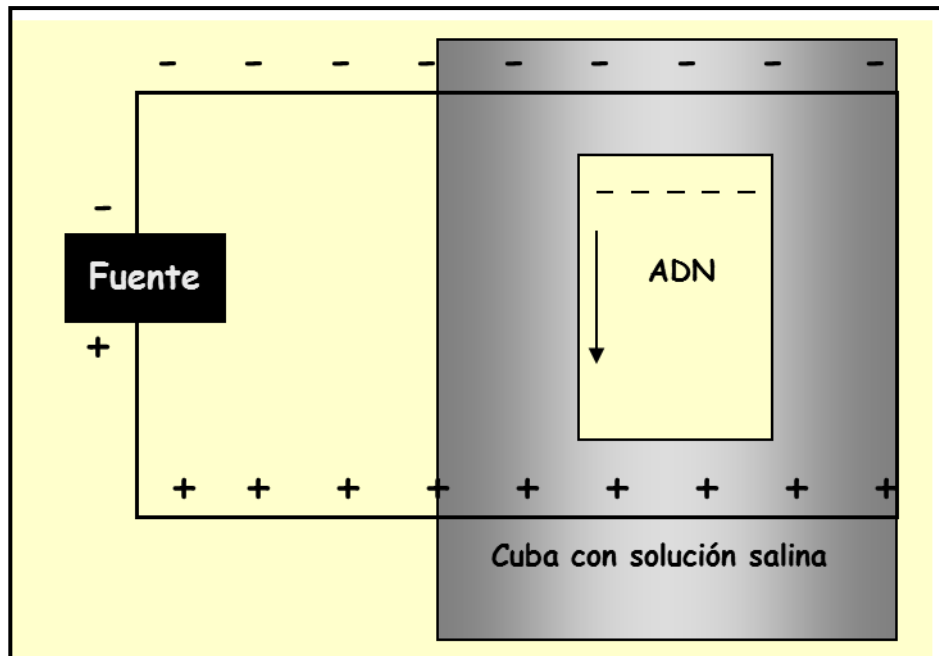
MATRICES o MEDIOS DE SOPORTE: Gel de Agarosa / Gel de Poliacrilamida

Análisis de los Productos de PCR en electroforesis en gel de agarosa



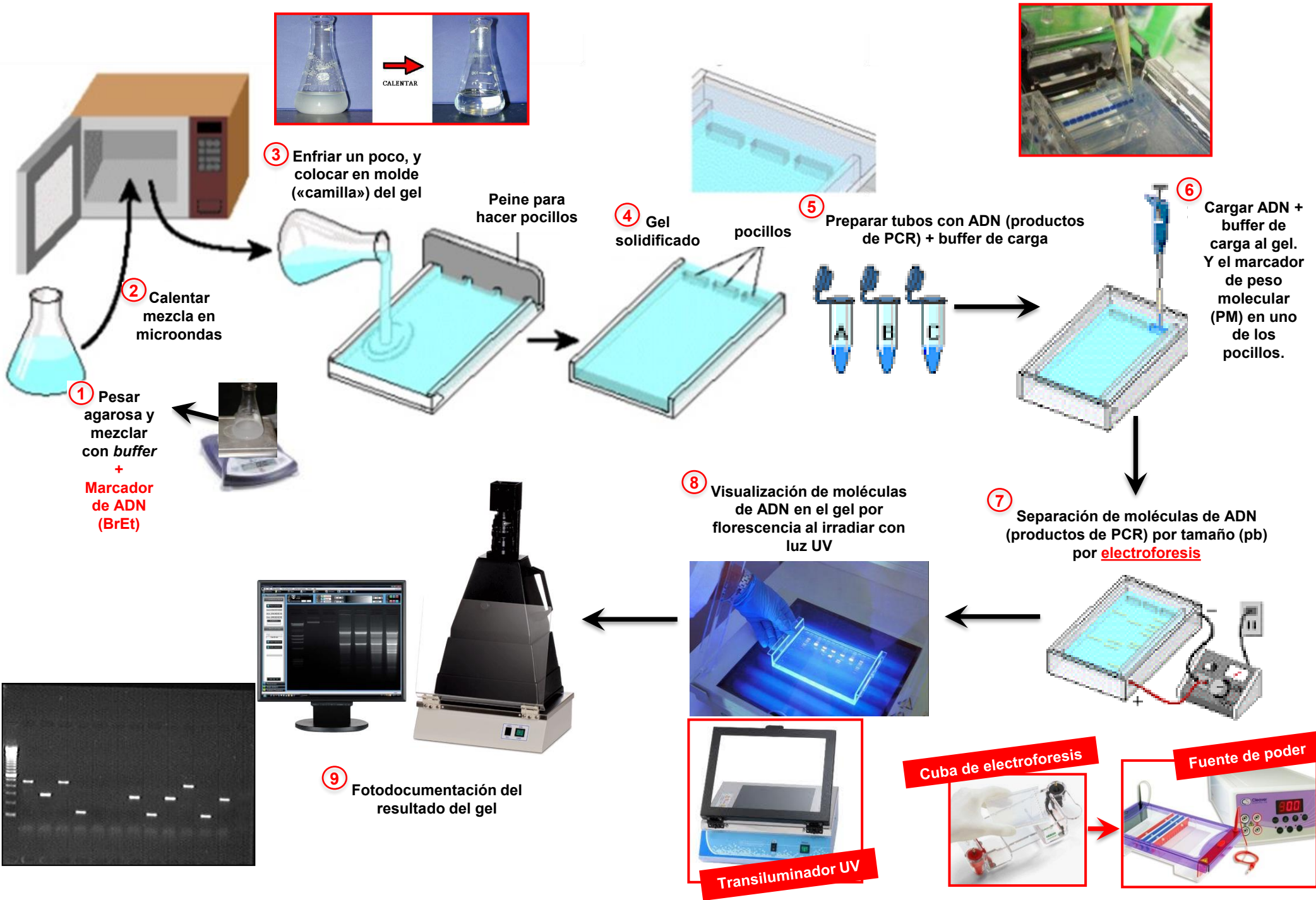
%	tamaño
0,7 -----	0,8 – 12 kb
1,0 -----	0,5 – 10 kb
1,2 -----	0,4 – 7 kb
1,5 -----	0,2 – 3 kb

En la electroforesis, el gel es colocado en una cuba con solución salina y una corriente eléctrica es aplicada. El ADN en solución producto de la PCR migra para el polo positivo.



En corridas de electroforesis, el ADN menor siempre gana!

Electroforesis de ADN en gel de agarosa: procedimiento



Electroforesis del producto de la PCR

CONTROLES

NEGATIVO

- ➔ Monitoreo de la contaminación.
- ➔ Descarta falsos positivos.

POSITIVO

- ➔ Verificar la correcta realización del proceso.
- ➔ Comparar el tamaño de la banda esperada.
- ➔ Descarta falsos negativos.

CONTROL NEGATIVO: Mix de reacción sin muestra (completo con agua ultrapura)

CONTROL POSITIVO: Cepas de referencia (obtenida en el laboratorio)

Videos: electroforesis de ADN en gel de Agarosa:

<https://www.youtube.com/watch?v=XSO4ZBzu4jA>

<http://www.jove.com/video/3923/agarose-gel-electrophoresis-for-the-separation-of-dna-fragments>

VARIANTES DE LA PCR

- ➔ **RT-PCR** (*Retro-Transcripción-PCR*)
- ➔ **PCR en tiempo real o *quantitative* PCR (qPCR)**
- ➔ **PCR Multiple (*Multiplex PCR*)**
- ➔ **PCR Anidada (*Nested PCR*)**
- ➔ **PCR *in situ***

RT-PCR

➡ Para virus ARN / ARNm

➡ Se realiza un paso previo de Retro transcripción

Extracción ARN de Muestra



Agrego enzima RT (la *Taq* no reconoce molde ARN)



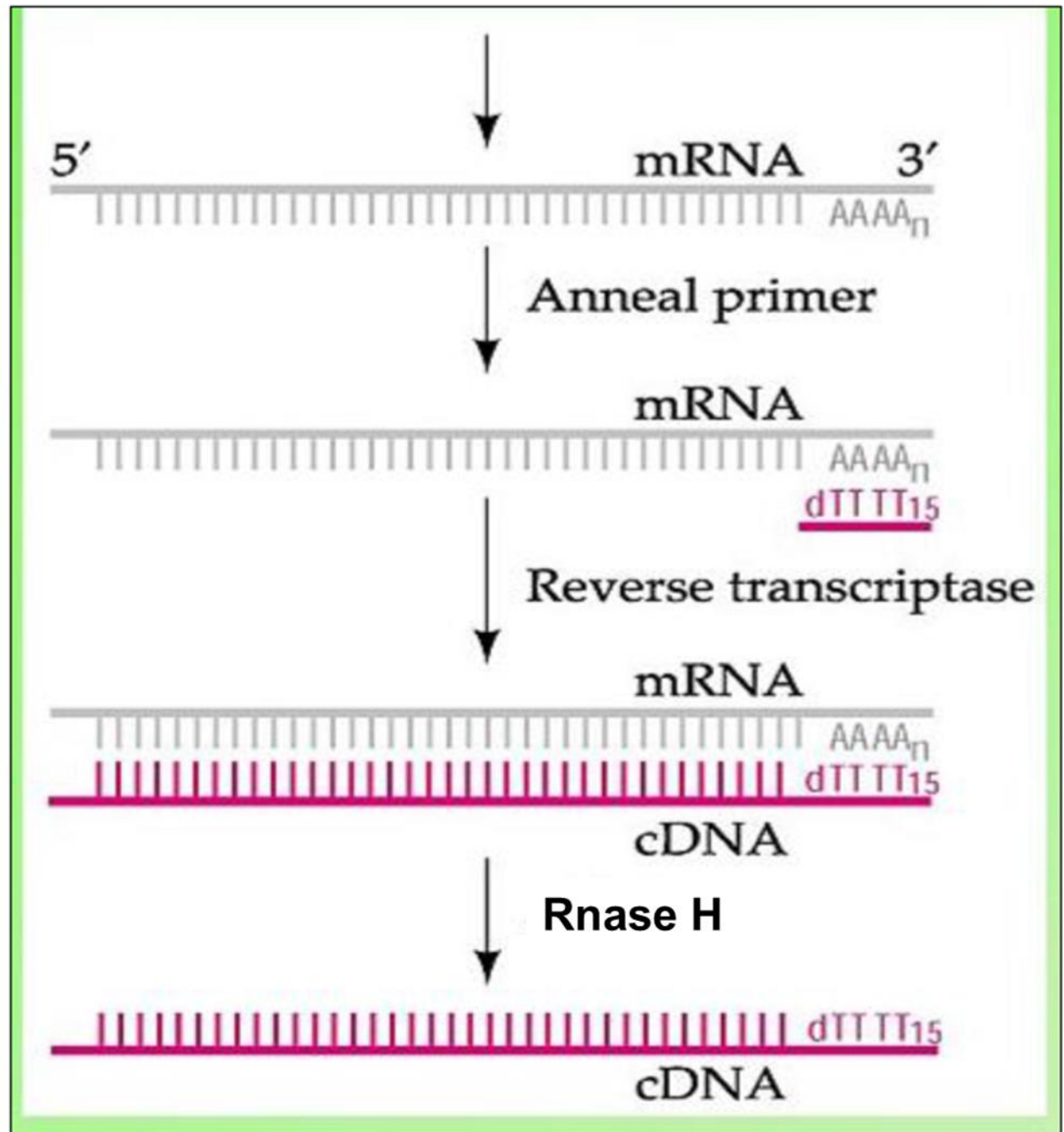
Obtengo ADN copia (ADNc o *cDNA*)



PCR convencional

RT-PCR

ARNm



PCR en tiempo real (qPCR)

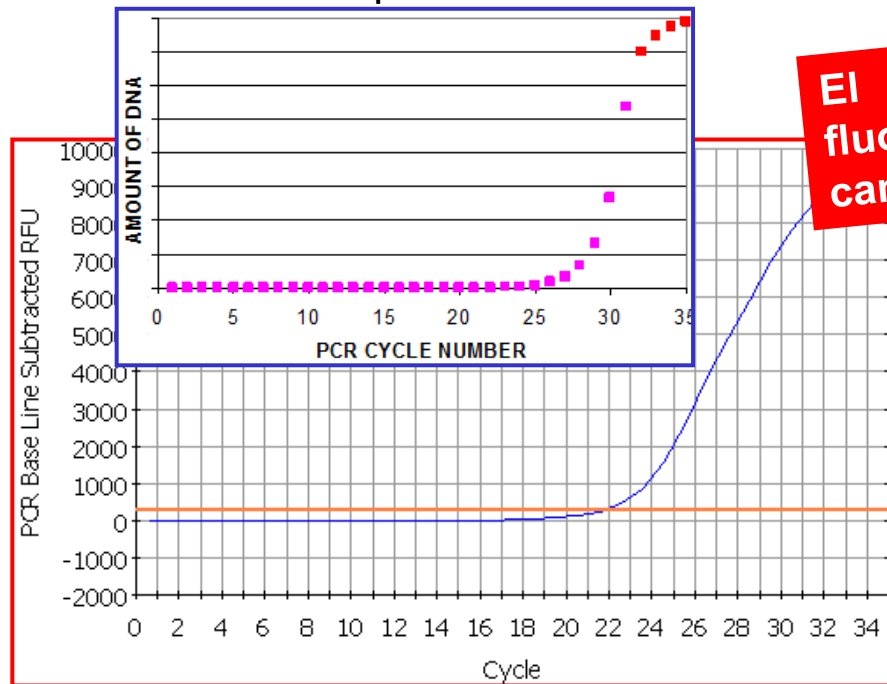
FUNDAMENTO:

La PCR en tiempo real (qPCR) amplifica y simultáneamente detecta un ADN molde específico mediante el uso de fluoróforos. Permite medir la tasa de generación del producto luego de cada ciclo de amplificación.

UTILIZA LOS MISMOS REACTIVOS QUE LA PCR CONVENCIONAL...

+

UN FLUORÓFORO que, en un termociclador que albergue sensores para medir fluorescencia tras excitar dicho fluoróforo a la longitud de onda apropiada, permita medir la tasa de generación de uno o más productos de PCR específicos.

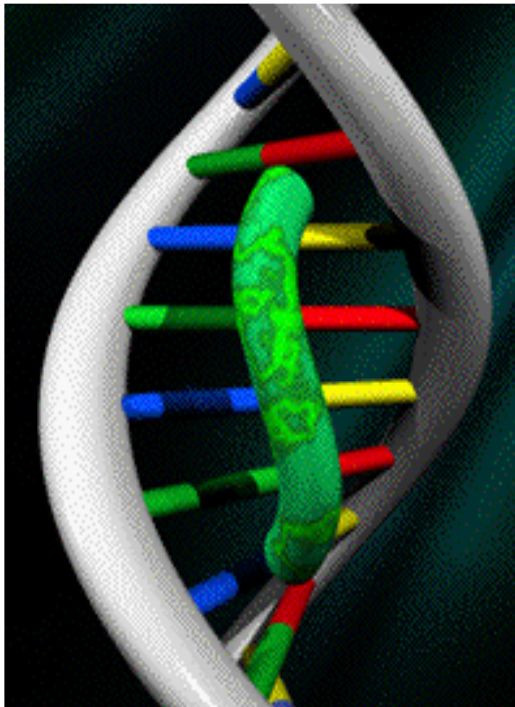


El aumento en la intensidad de la fluorescencia es proporcional a la cantidad de producto de PCR producido.

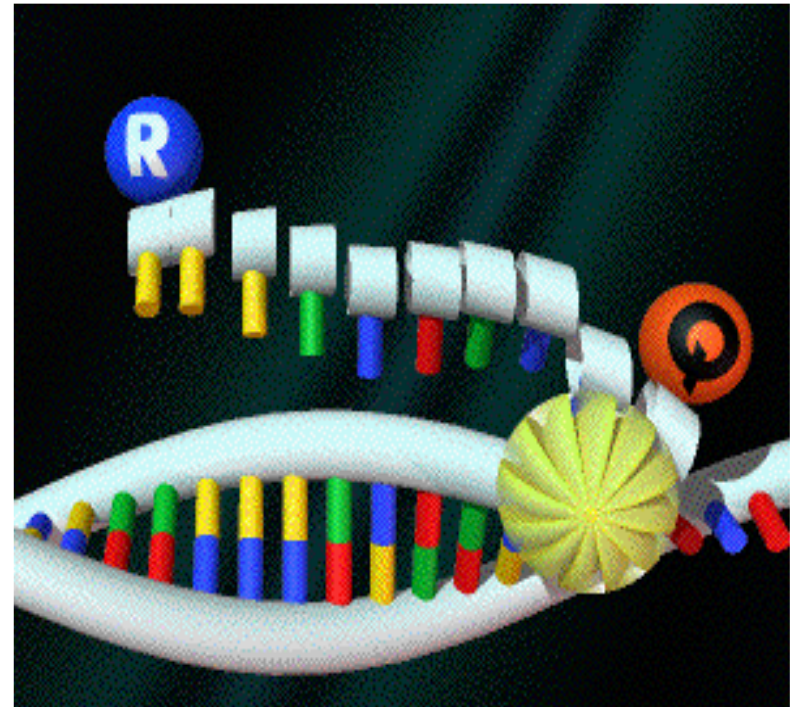


PCR en tiempo real (qPCR)

SYBR Green

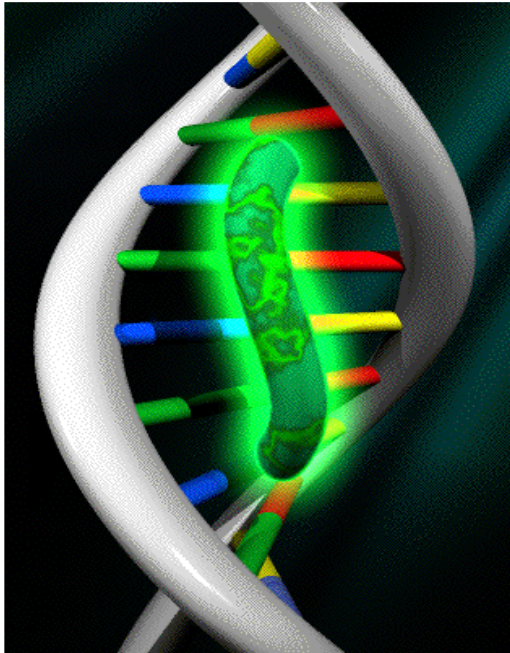


TaqMan

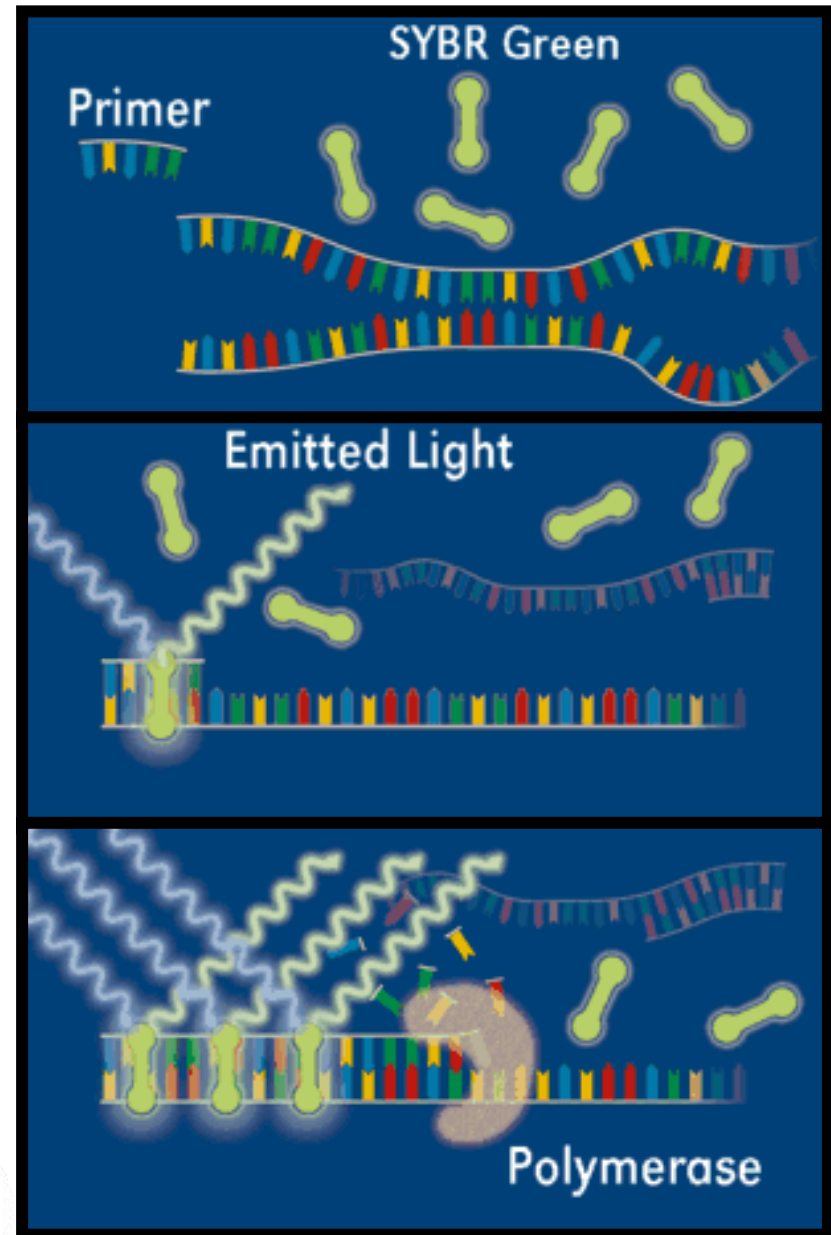
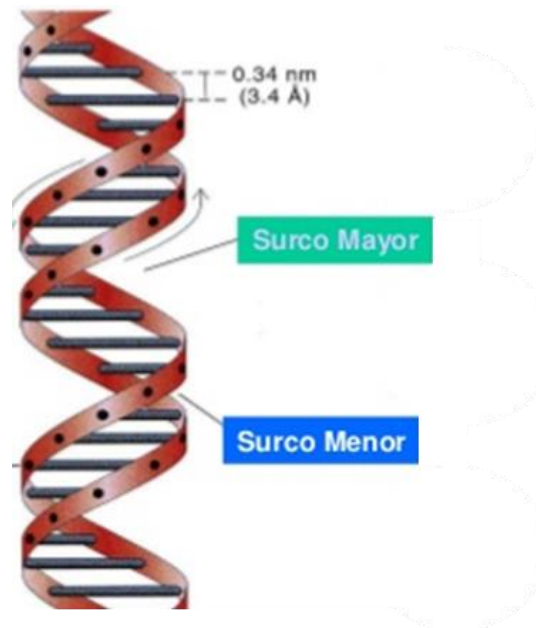


PCR en tiempo real (qPCR)

SYBR Green

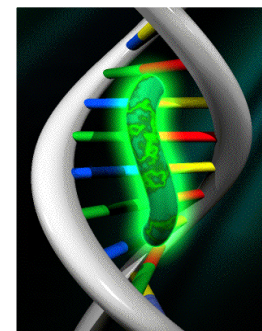


Fluoróforo que se asocia a la molécula de ADN interactuando con la hendidura menor del ADN.



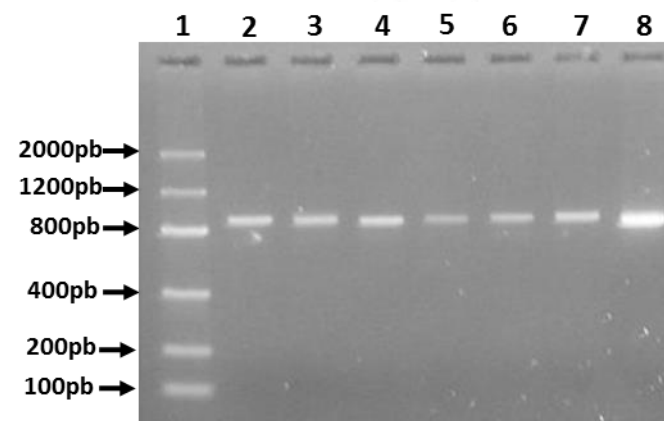
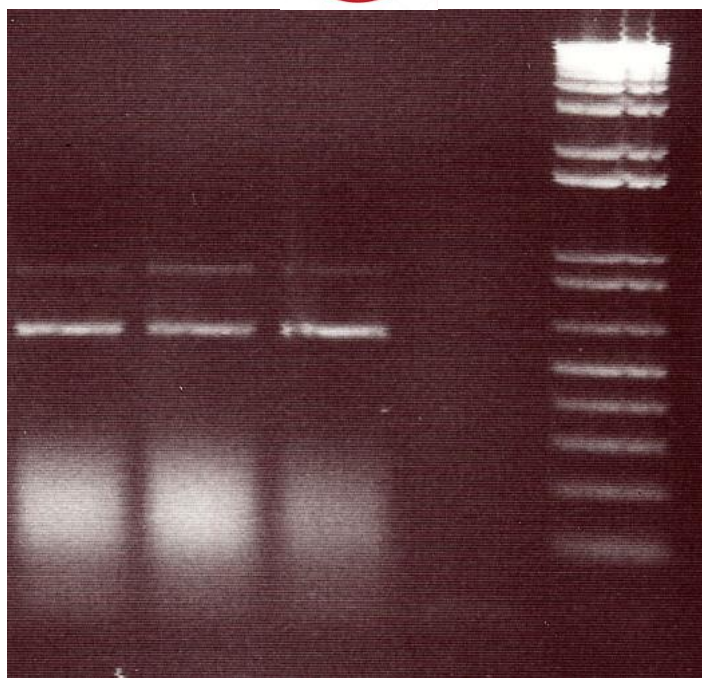
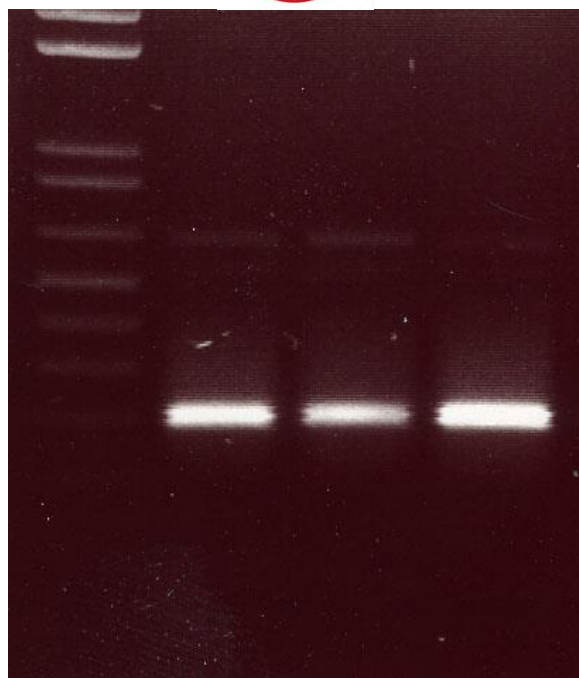
PCR en tiempo real (qPCR)

SYBR Green



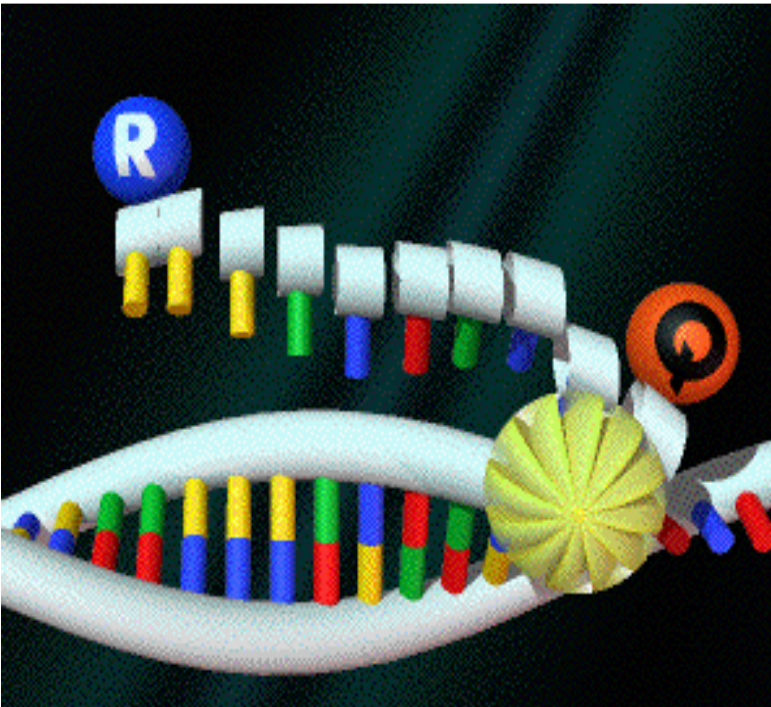
➡ Todo el ADN doble cadena amplificado en la PCR es detectado!

➡ Importante tener un protocolo de PCR que amplifique SOLO nuestro producto de PCR, sin «bandas inespecíficas»:



PCR en tiempo real (qPCR)

TaqMan



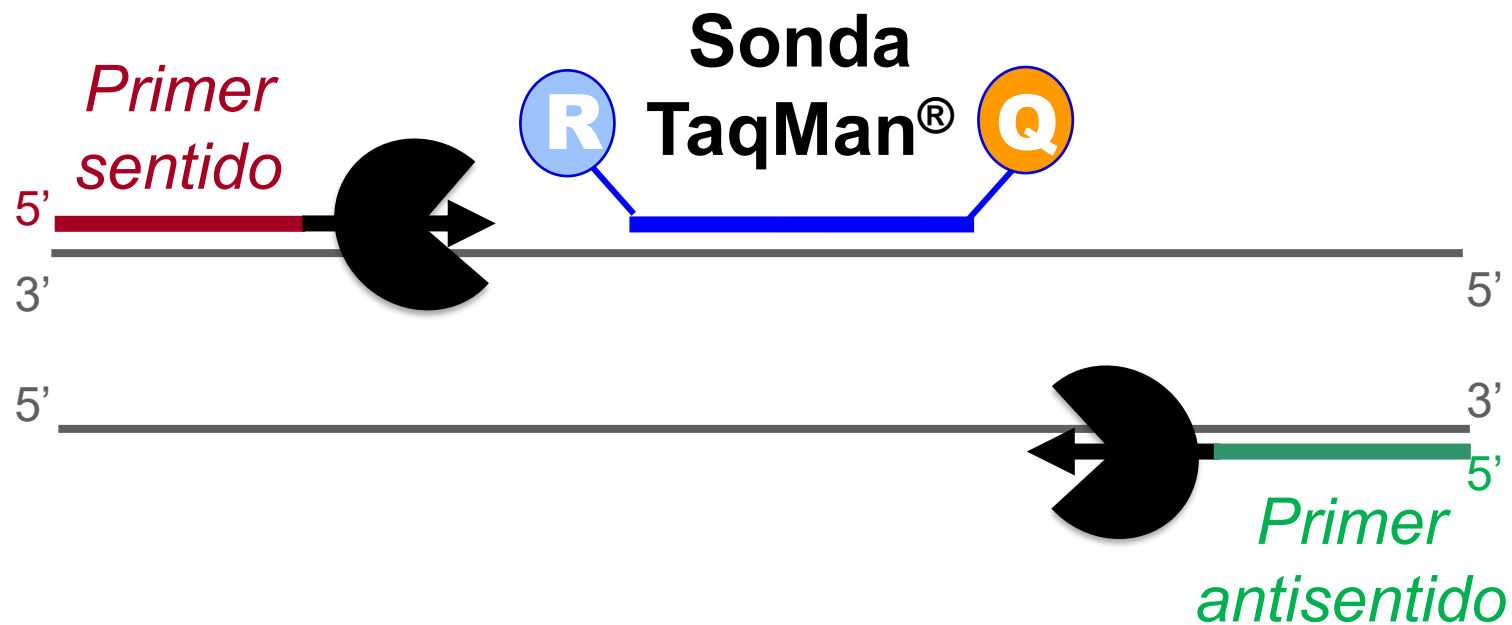
Utiliza un oligonucleótido (sonda),
unida a un fluoróforo y a un
Quencher, que se une
específicamente a nuestro producto
de PCR.



Podemos asumir que solamente se
detecta el producto de PCR!

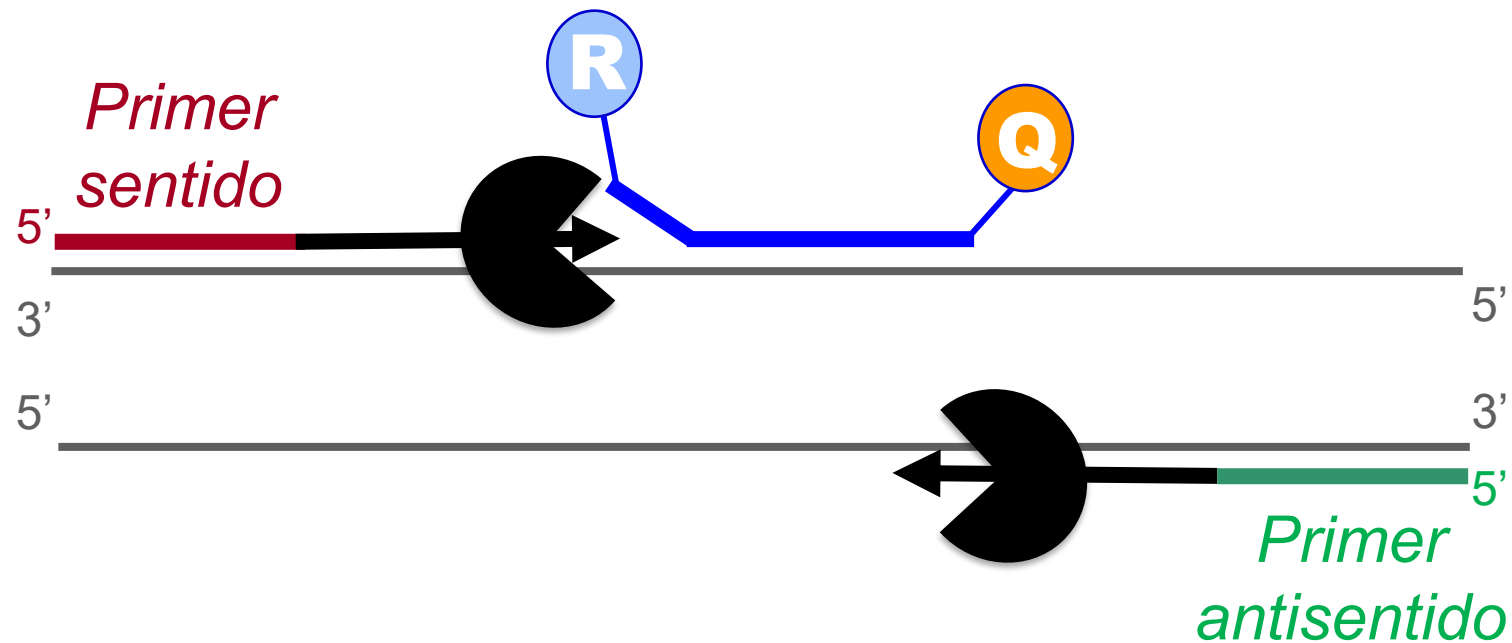
TaqMan

1) Polimerización



TagMan

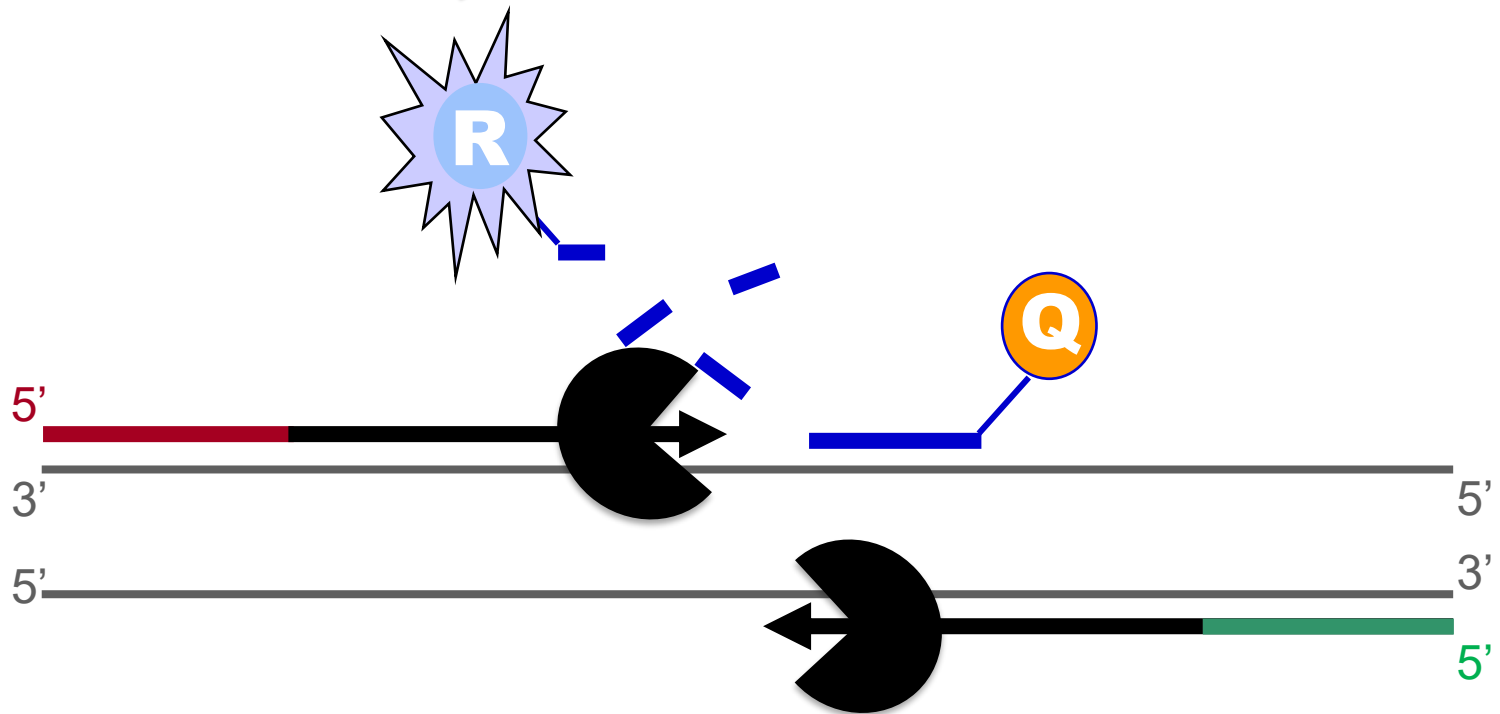
2) Remplazo/Sustitución



PCR en tiempo real (qPCR)

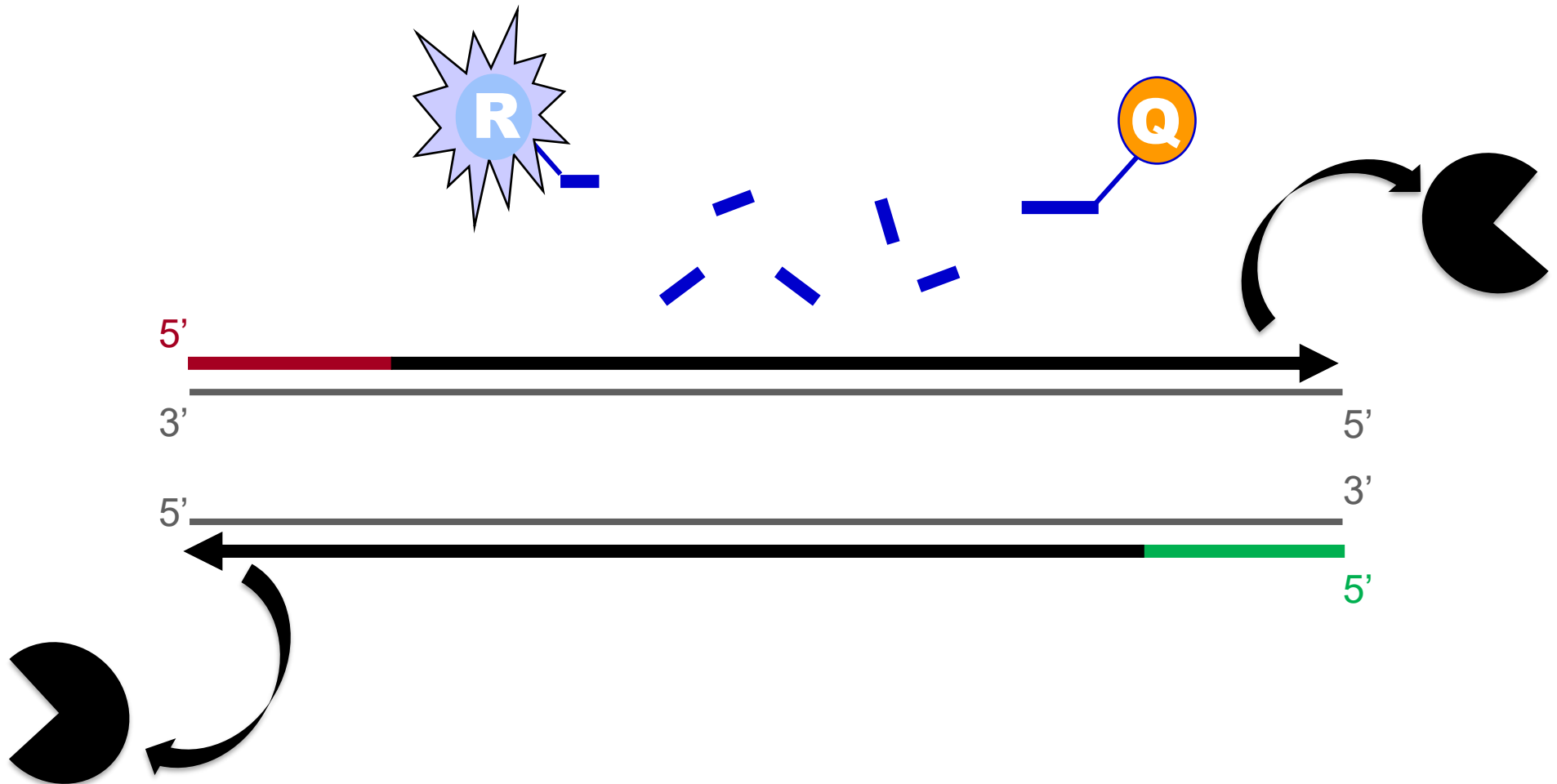
TaqMan

3) Hidrolisis



TagMan

4) Polimerización completa



APLICACIONES

Genotipificación

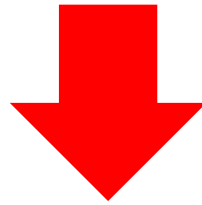
Cuantificación de carga viral

Cuantificar nro. copias de un gen

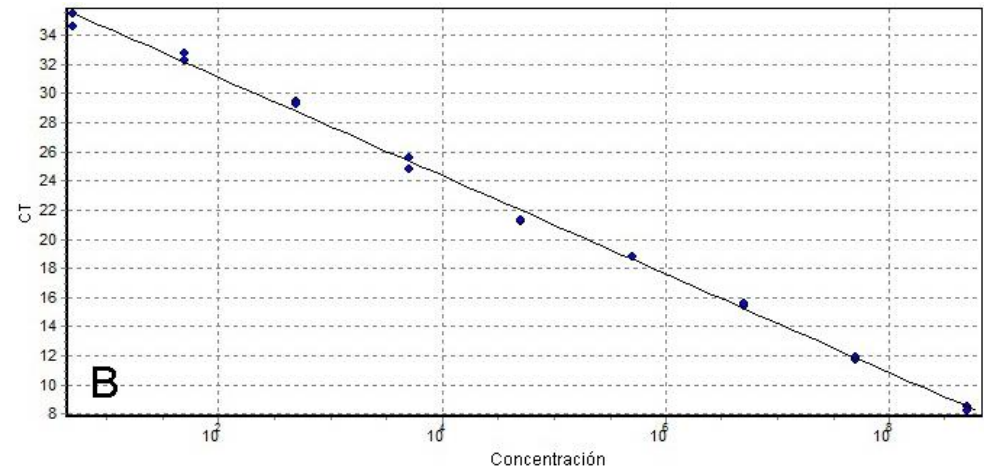
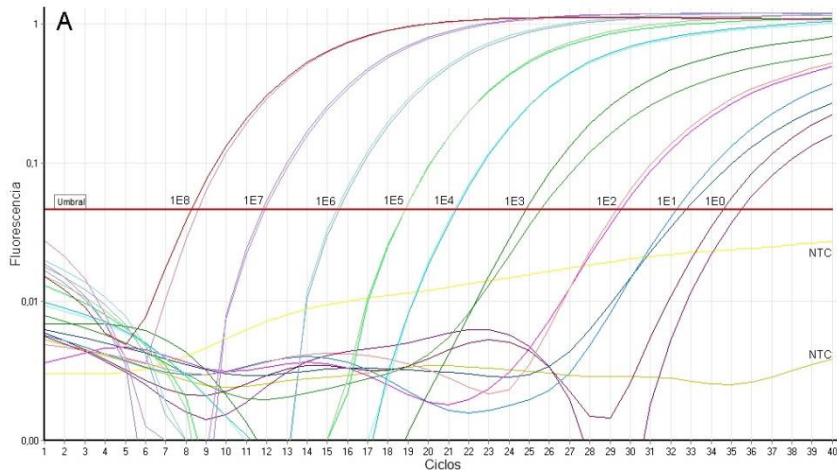
Cuantificación de expresión génica

Cuantificación por qPCR

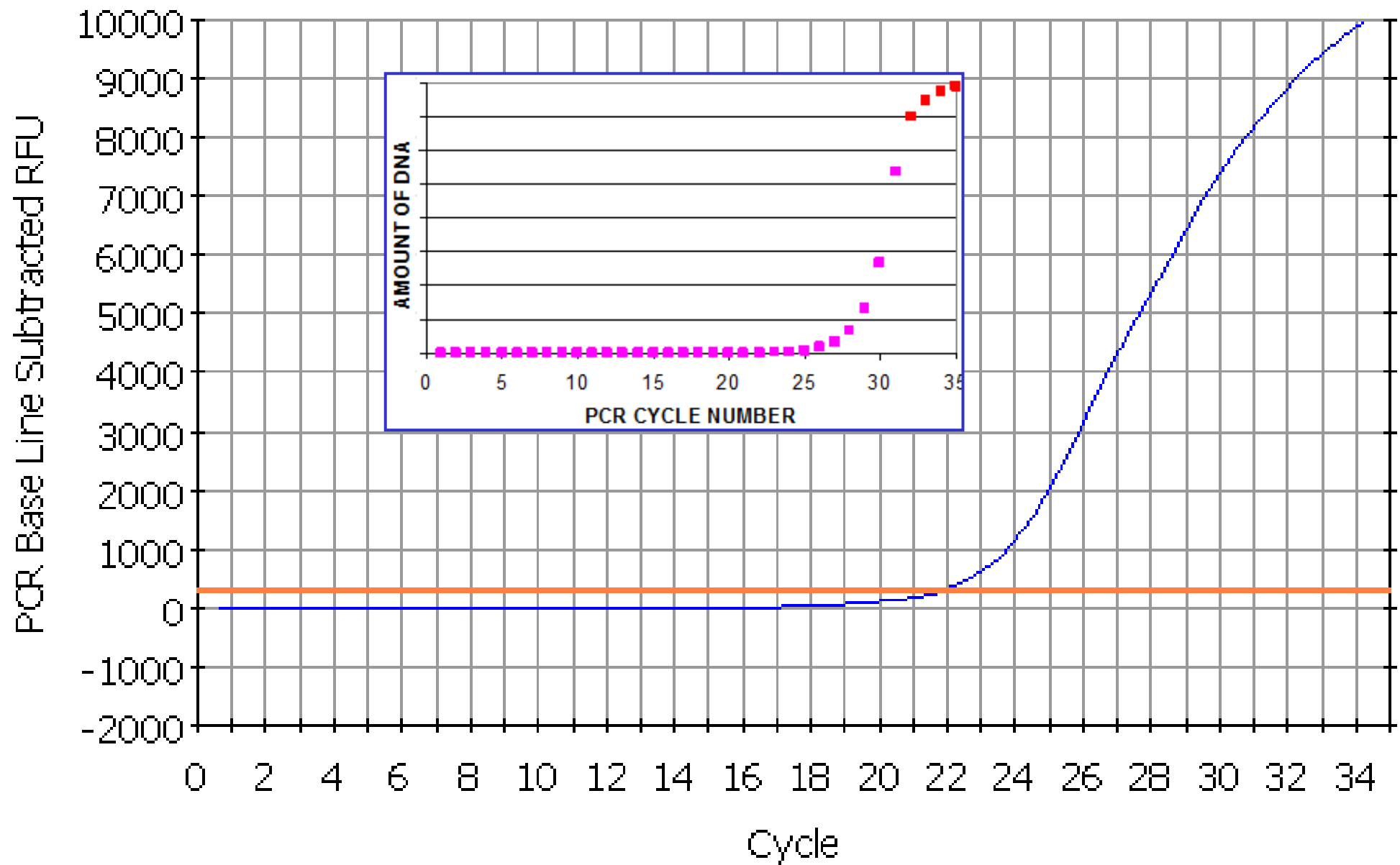
Se puede determinar el número de copias inicial o la concentración de moléculas de ácidos nucleicos. Para esto se requiere previamente del producto de PCR, cuidadosamente cuantificado.



Comparación de amplificación de muestra/s problema con concentraciones de la “**Curva Estándar**”

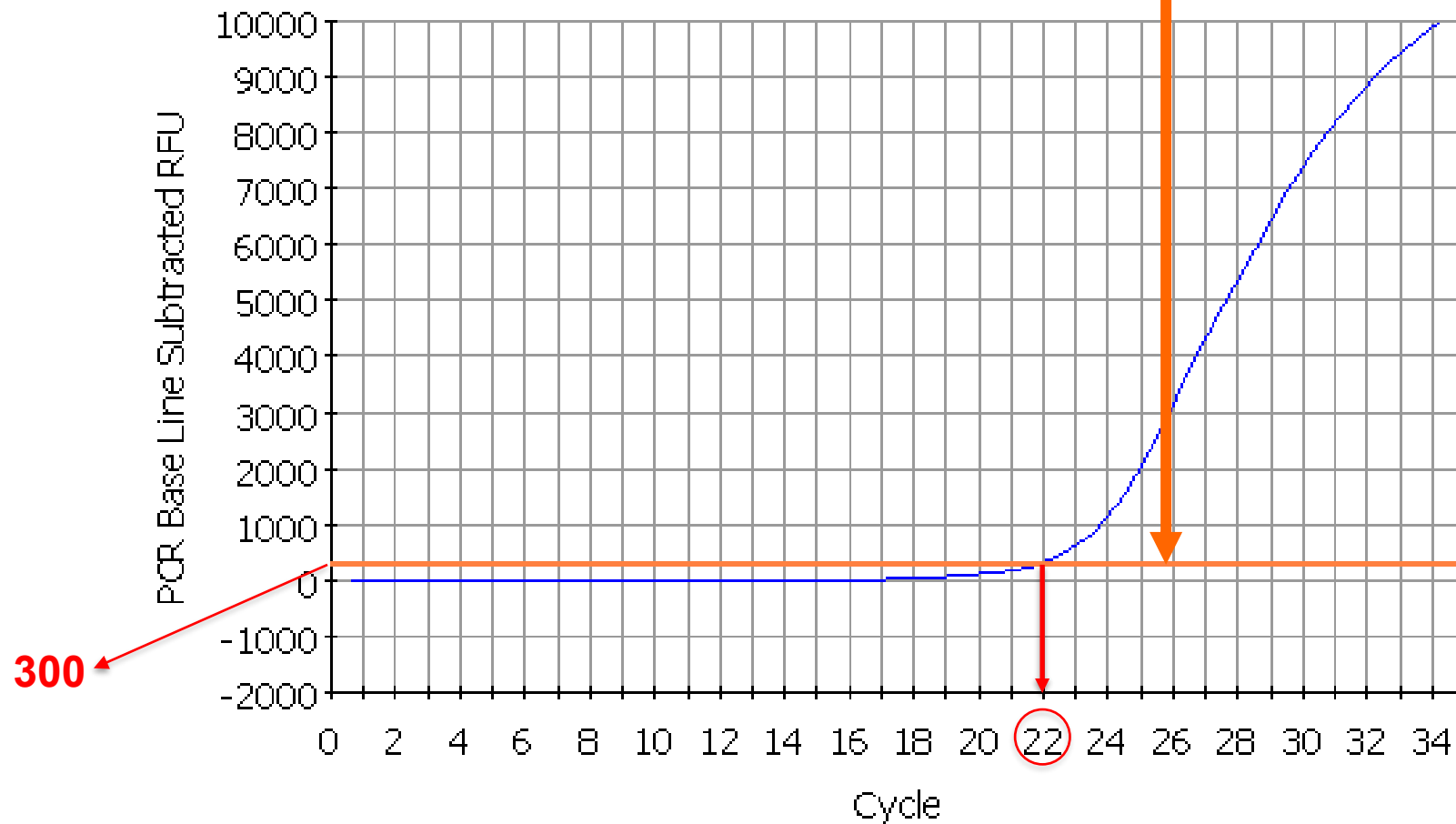


Cuantificación por qPCR

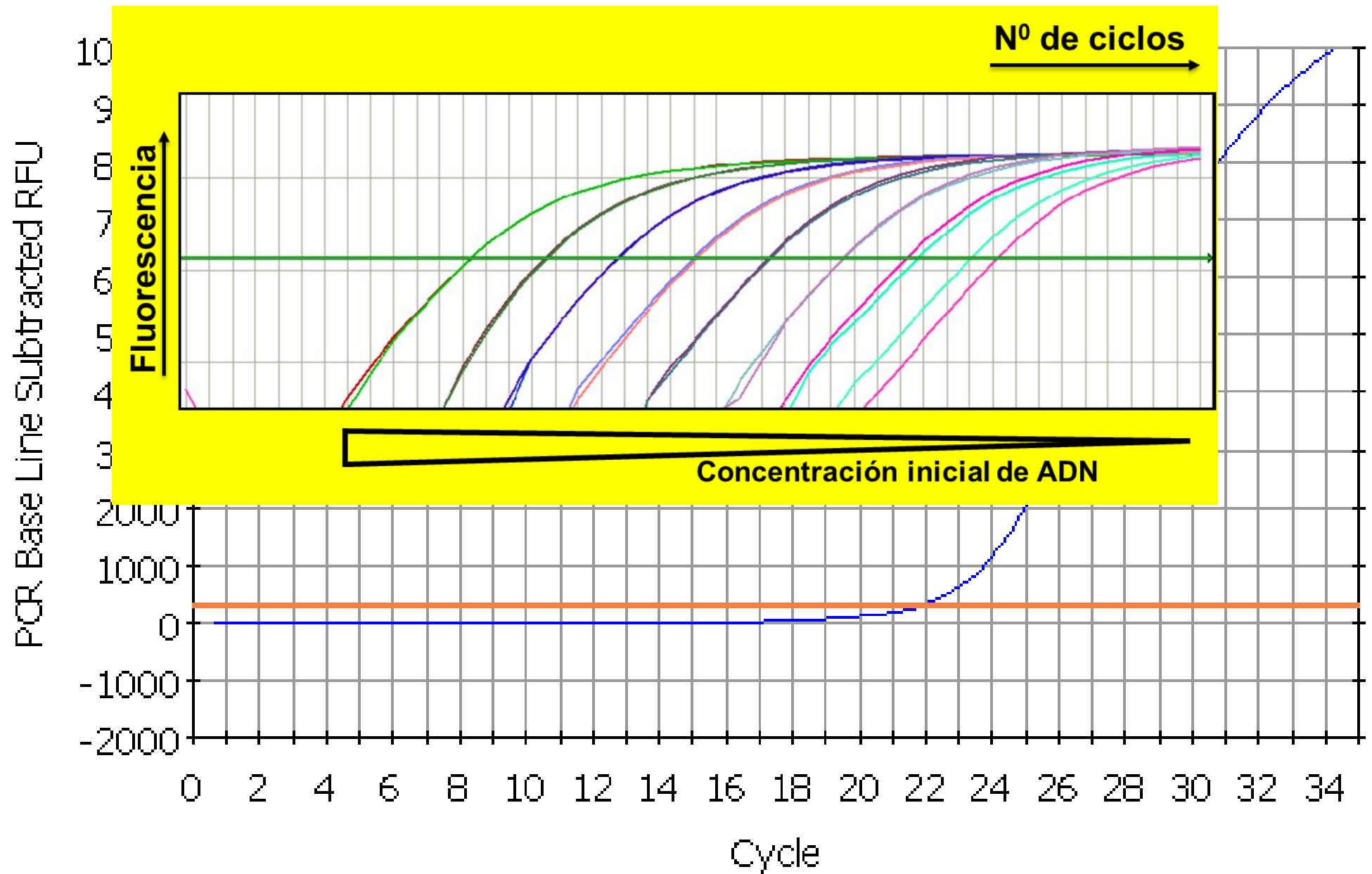


$$\text{Threshold (t)} = 300 / C_t = 22$$

Cuantificación por qPCR

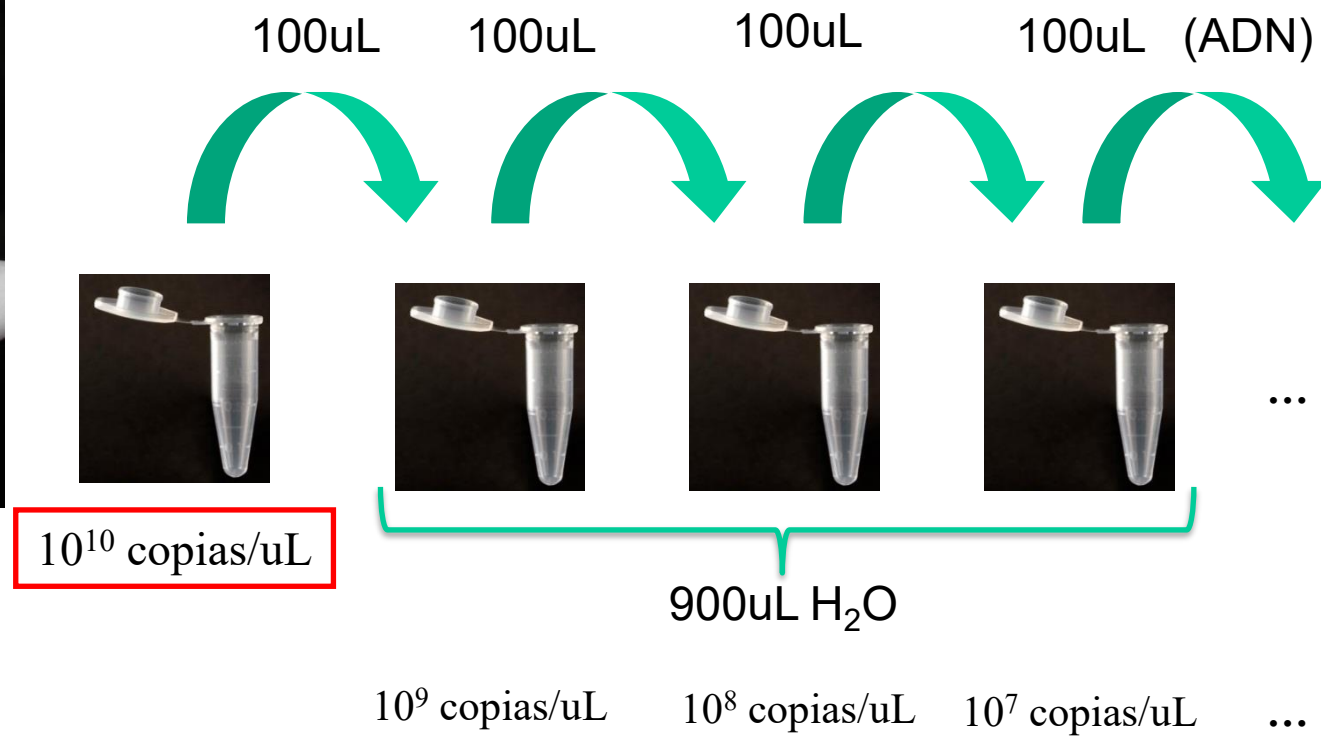


Cuantificación por qPCR

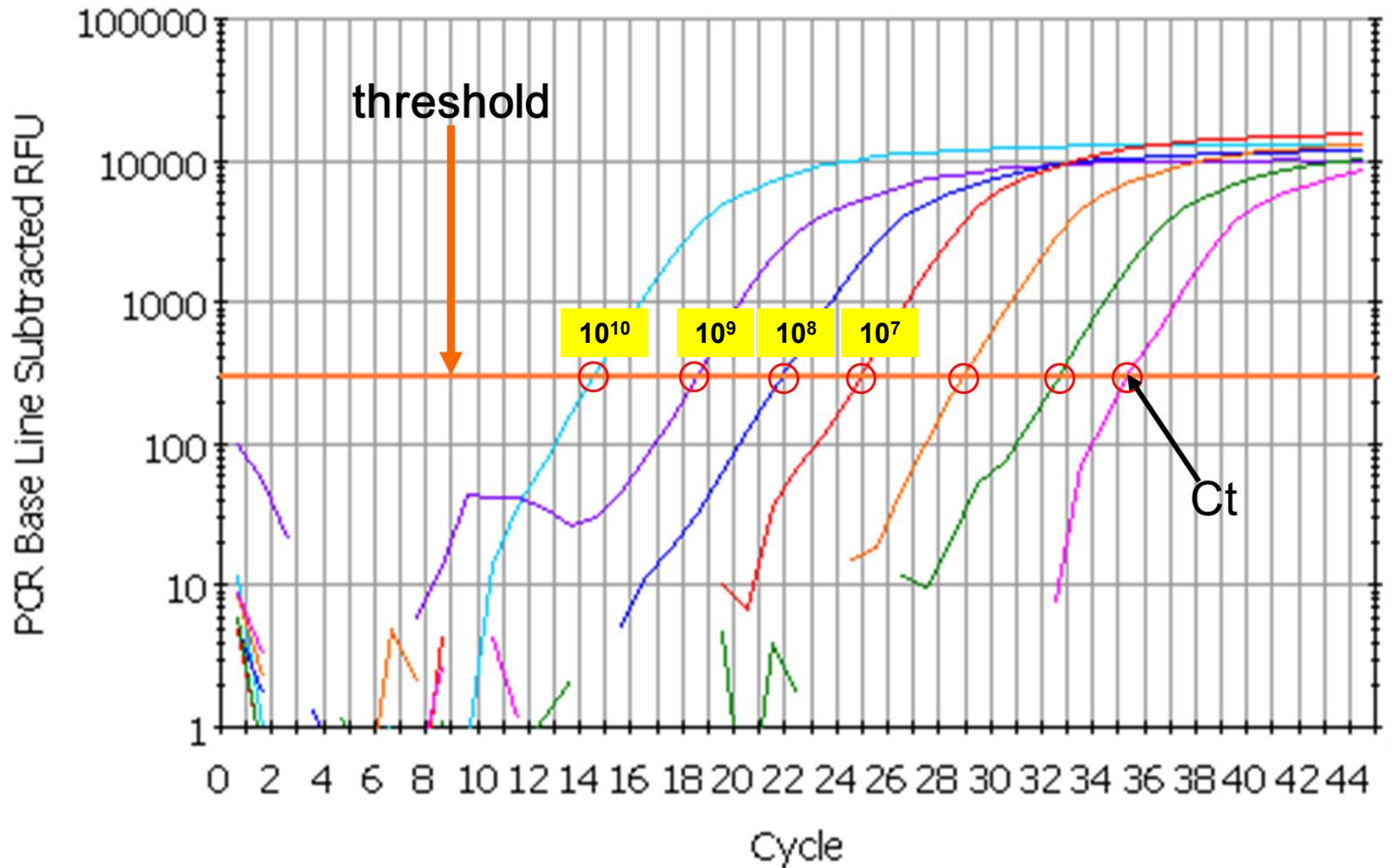


Construcción de la Curva Estándar

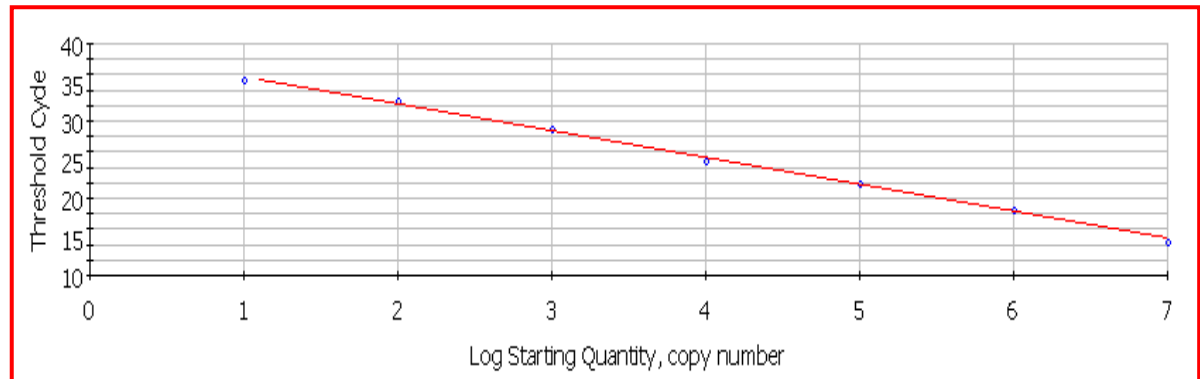
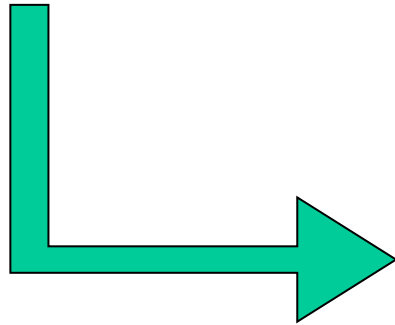
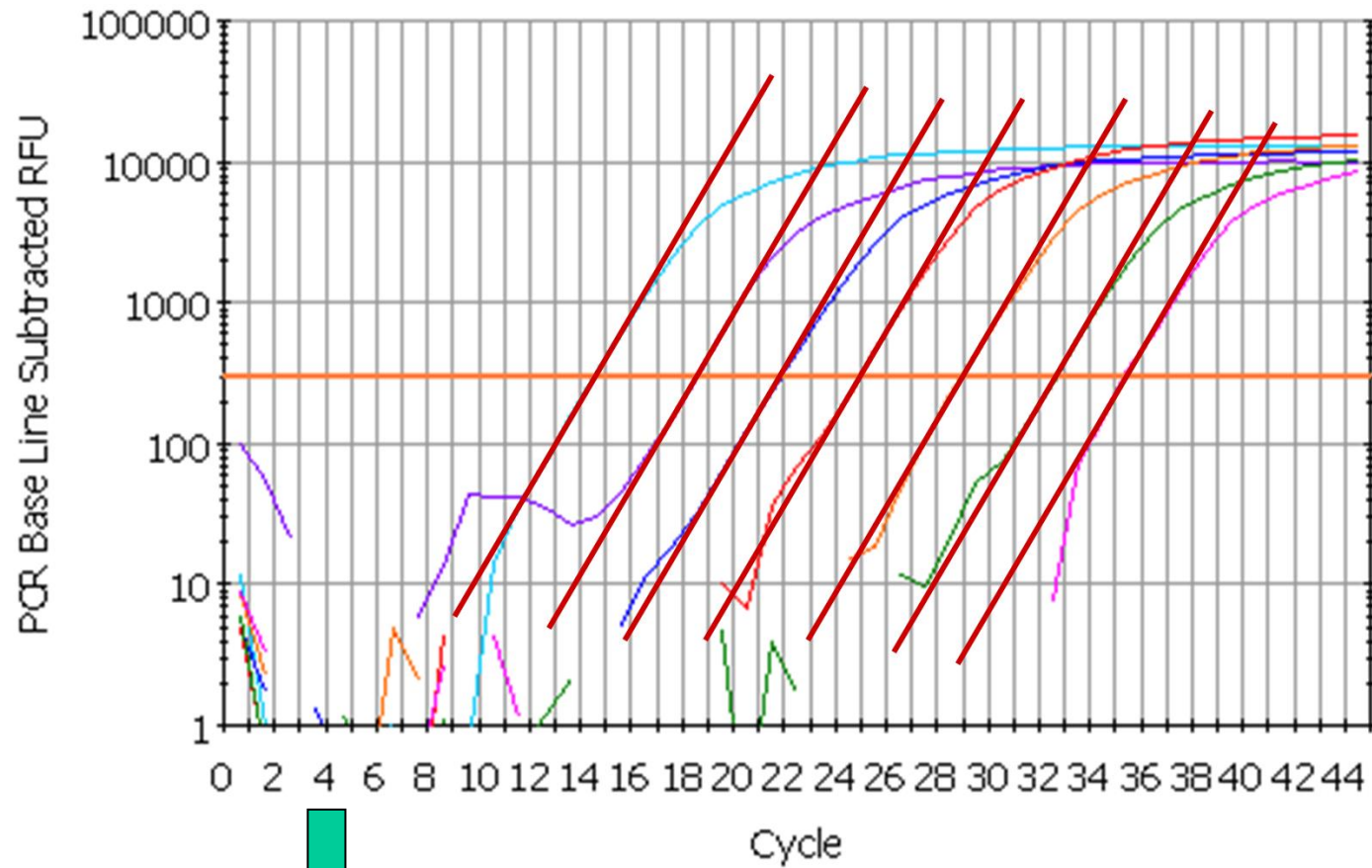
Dilución seriada



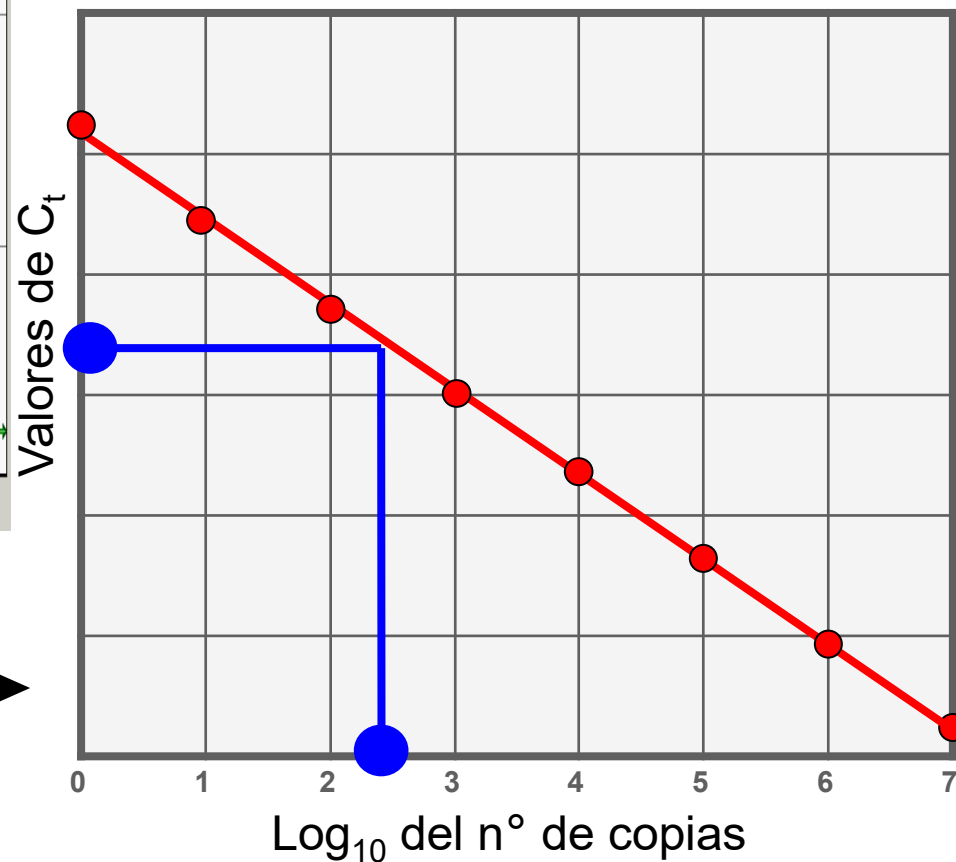
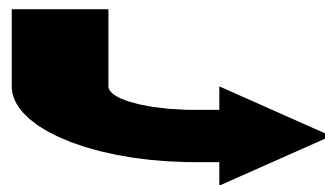
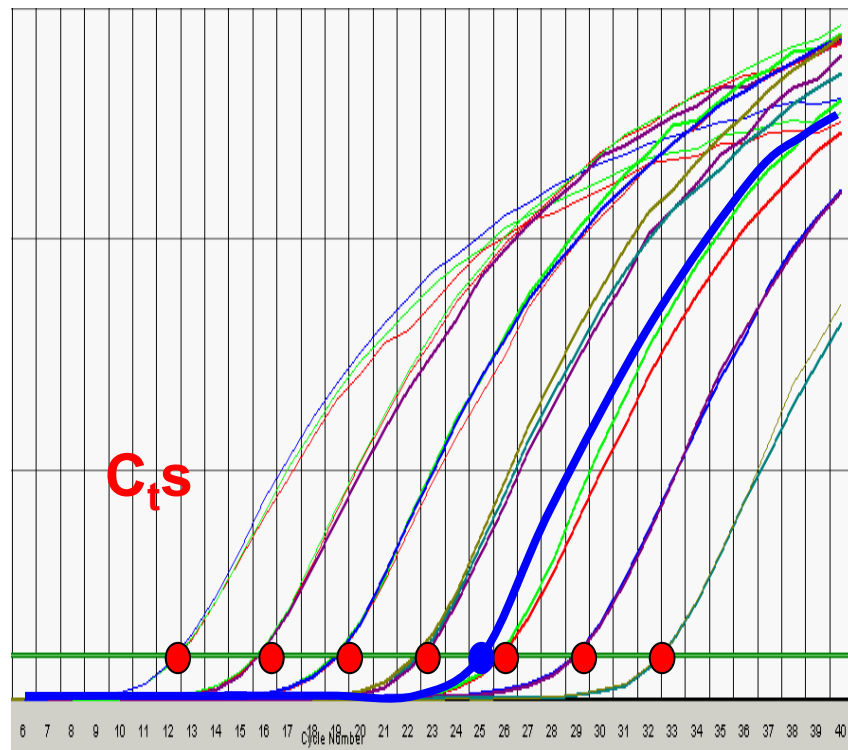
Construcción de la Curva Estándar



Construcción de la Curva Estándar



Cuantificación por qPCR



Ventajas de cada una:

PCR EN TIEMPO REAL

- ➡ MAS RAPIDA
- ➡ MAS SENSIBLE Y ESPECIFICA
- ➡ MENOR RIESGO CONTAMINACION
- ➡ NO REQUIERE PROCESAMIENTO POST- PCR
- ➡ PROCESA MAYOR NUMERO DE MUESTRAS
- ➡ CUANTIFICA EL ADN MOLDE

PCR A TIEMPO FINAL

- ➡ AMPLIFICA FRAGMENTOS DE GRAN TAMAÑO
- ➡ PERMITE ESTUDIOS FILOGENETICOS
- ➡ MAS FACIL PUESTA A PUNTO

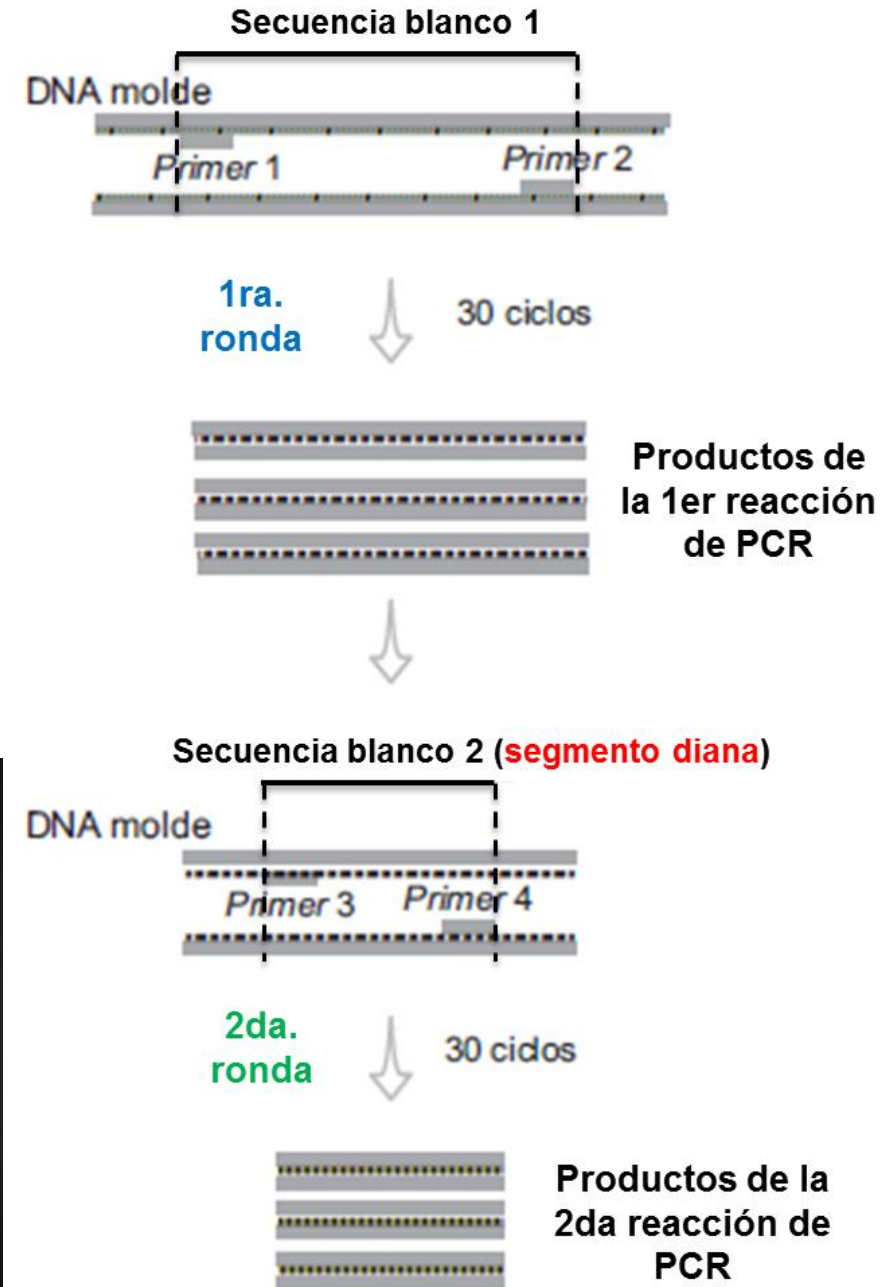
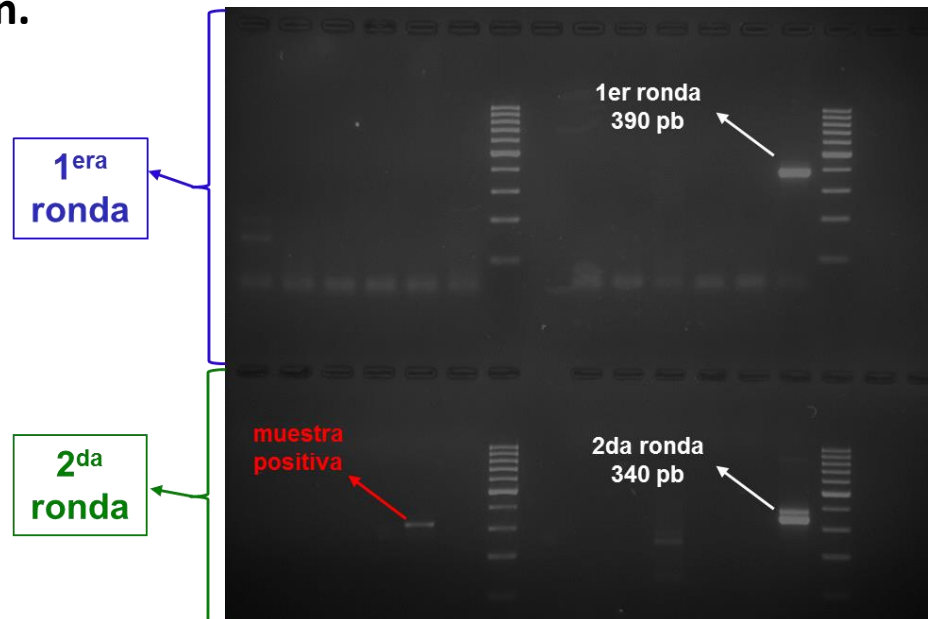
PCR Anidada

Comprende dos rondas de amplificación con distintos juegos de pares de *primers* en cada una.

1ra. Ronda: reacción con los *primers* externos, amplificar una región de ADN mas extensa, que contiene el **segmento diana**.

2da. Ronda: utiliza como molde de la reacción el producto de amplificación anterior, con *primers* internos para amplificar la región específica.

Incrementa la sensibilidad y especificidad de la detección.



PCR Múltiple

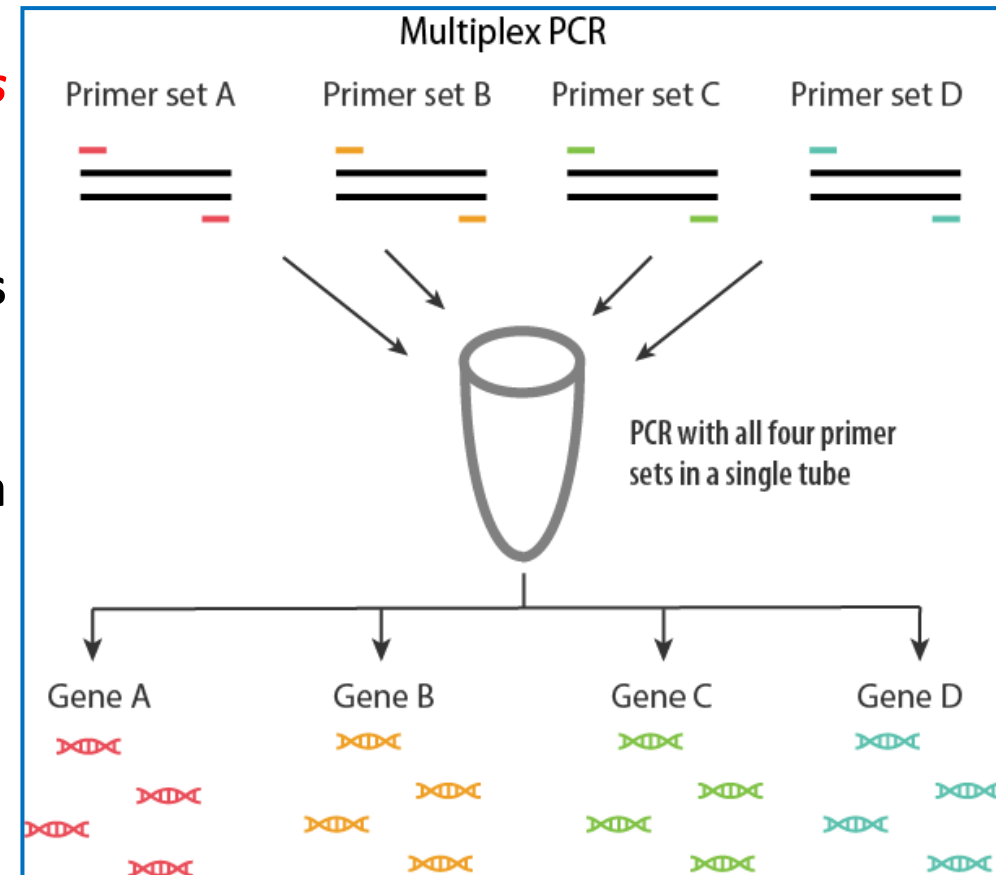
➔ **Amplificación simultánea de múltiples fragmentos en una única reacción.**

➔ **Para ello utiliza dos o mas «juegos» de pares de *primers* en la misma reacción**

➔ **Puede detectar a partir de una misma muestra:**

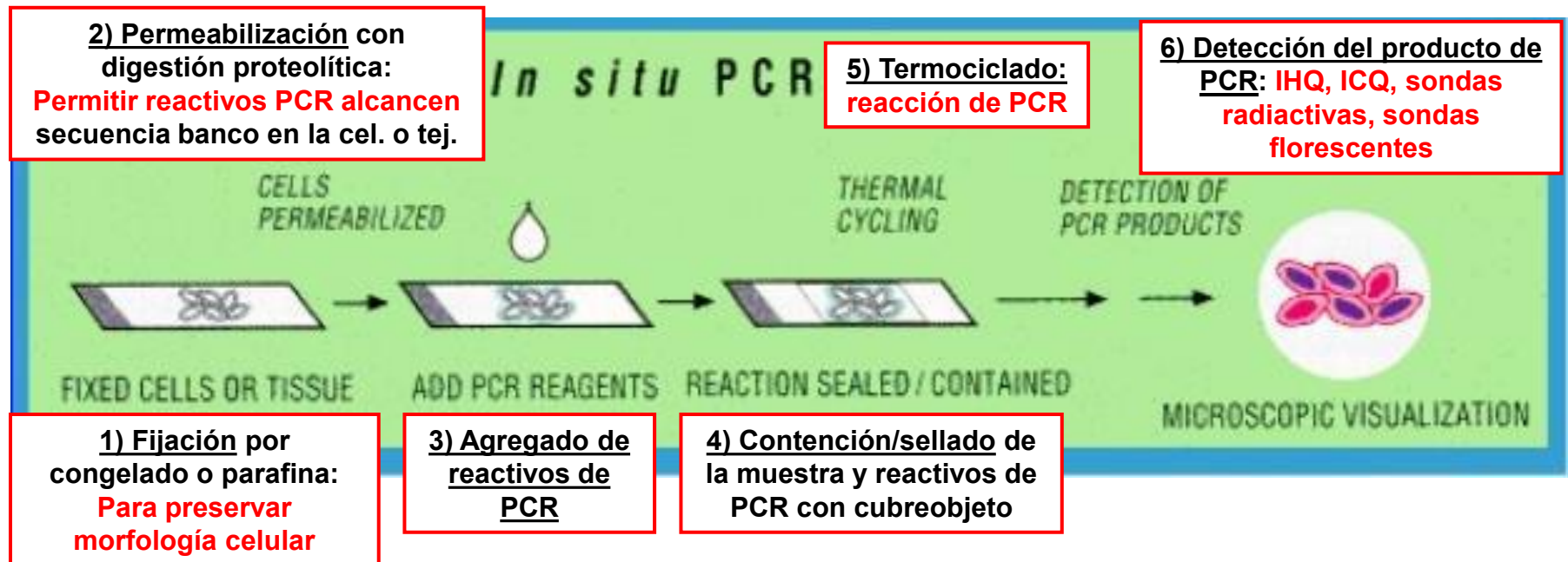
- diferentes virus
- diferentes genotipos de un virus
- diferentes regiones (o genes) de un mismo genoma

➔ **Puede realizarse por PCR convencional (cualitativa) o *qPCR* (utilizando diferentes sondas TaqMan® marcadas con diferentes fluoróforos)**



PCR *in situ*

- ➡ PCR sobre secciones histológicas o células.
- ➡ Los productos generados se visualizan en el sitio de amplificación.
- ➡ El producto amplificado se detecta por hibridación *in situ*.
- ➡ Se utiliza generalmente a partir de biopsias y raspajes.



Secuenciación de ADN

➡ Obtención de la secuencia exacta de nucleótidos de una molécula de ADN.

➡ Método clásico:

- Secuenciación de Sanger

- Generalmente luego de ser amplificada por PCR.

➡ Métodos modernos:

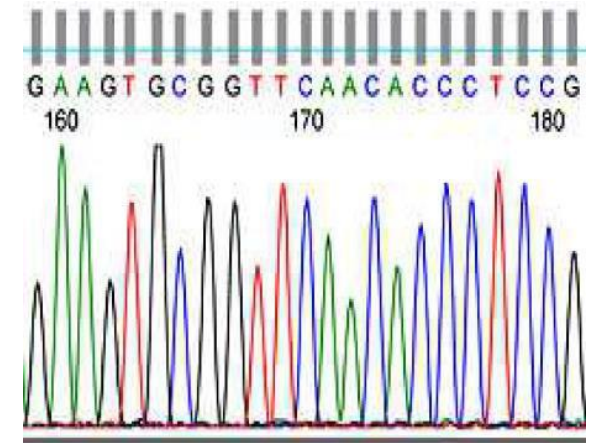
- Next Generation Sequencing (NGS).

- No es necesaria la amplificación previa por PCR.

- Gran revolución de la última década.

- Mucha más información en menos tiempo.

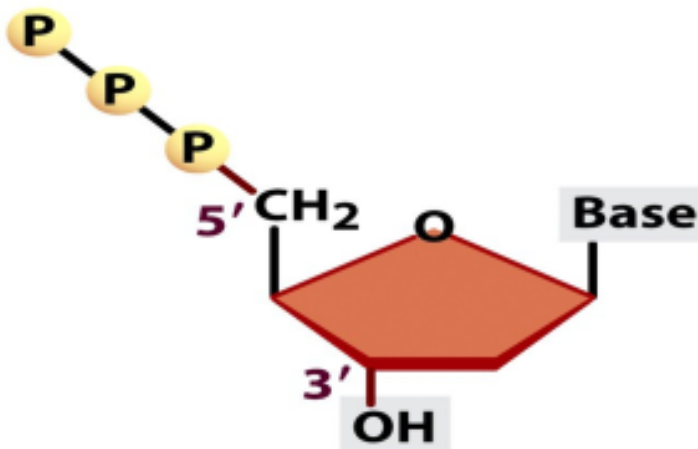
- Actualmente más costosos, y la información que generan es más difícil de analizar.



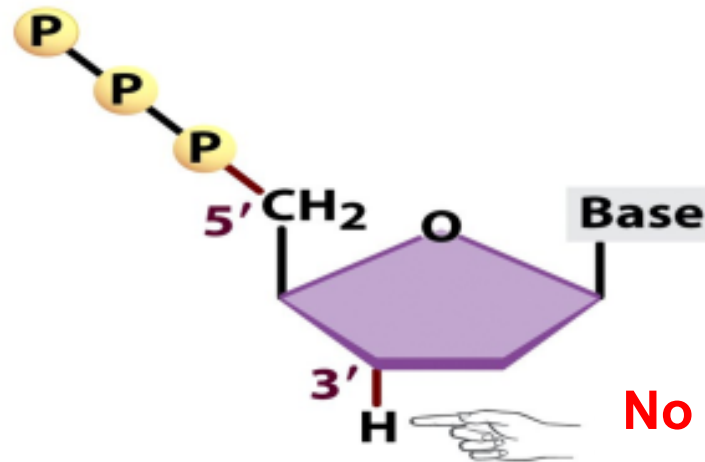
Secuenciación de Sanger

- ➔ Se basa en el uso de Didesoxinucleótidos Trifosfato (ddNTPs), que al ser incorporados a una hebra de ADN en crecimiento (polimerización), detienen la síntesis.

Los ddNTPs detienen la síntesis de ADN



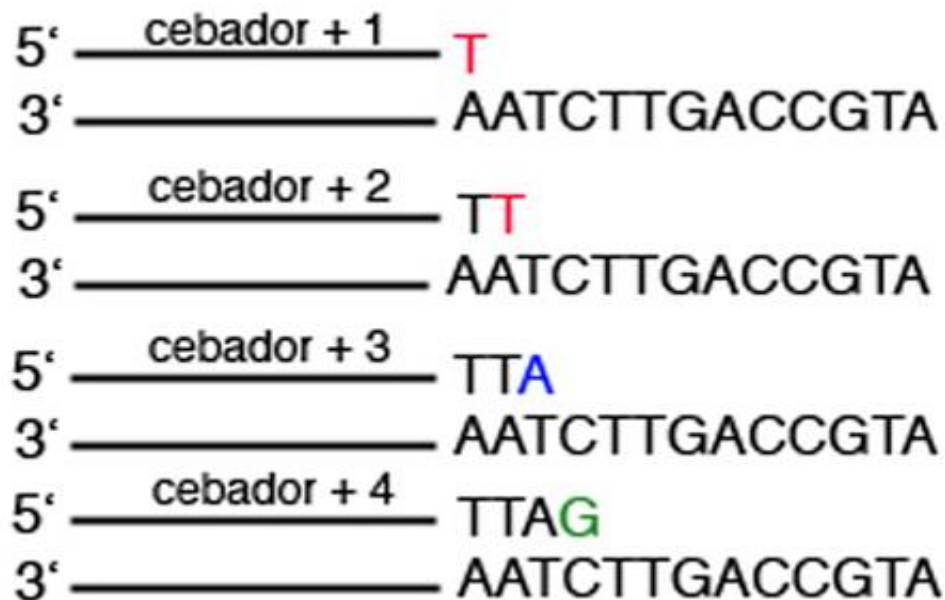
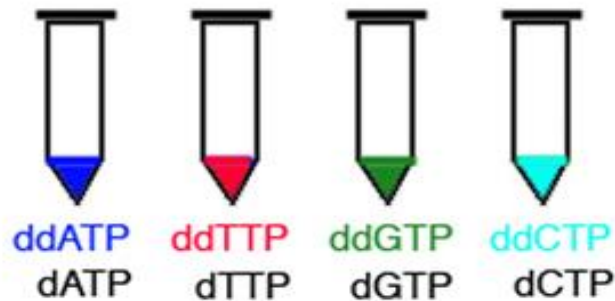
dNTPs
(extienden la
hebra de ADN)



ddNTPs
(detienen la
síntesis de ADN)

No hay OH en
carbono 3'!

Secuenciación de Sanger



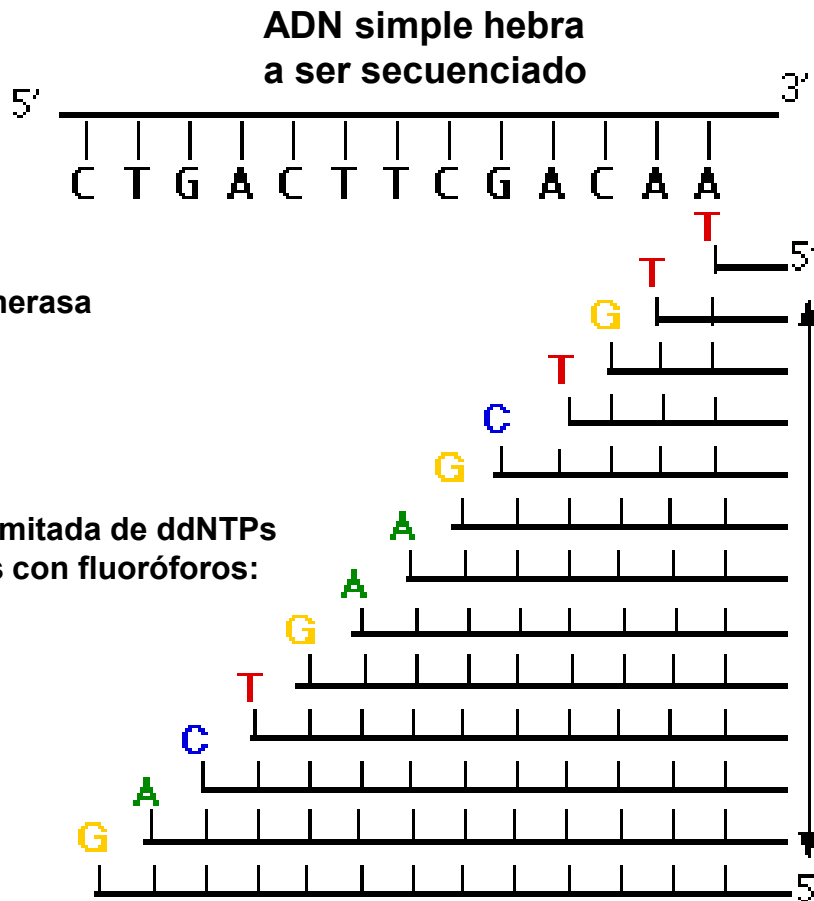
➔ Se emplean ddNTPs marcados con diferentes fluoróforos, los que se van incorporando en la secuencia nucleotídica amplificada, luego el secuenciador va a identificar los diferentes colores emitidos por cada uno de ellos.



Secuenciador automático

Secuenciación de Sanger

1)

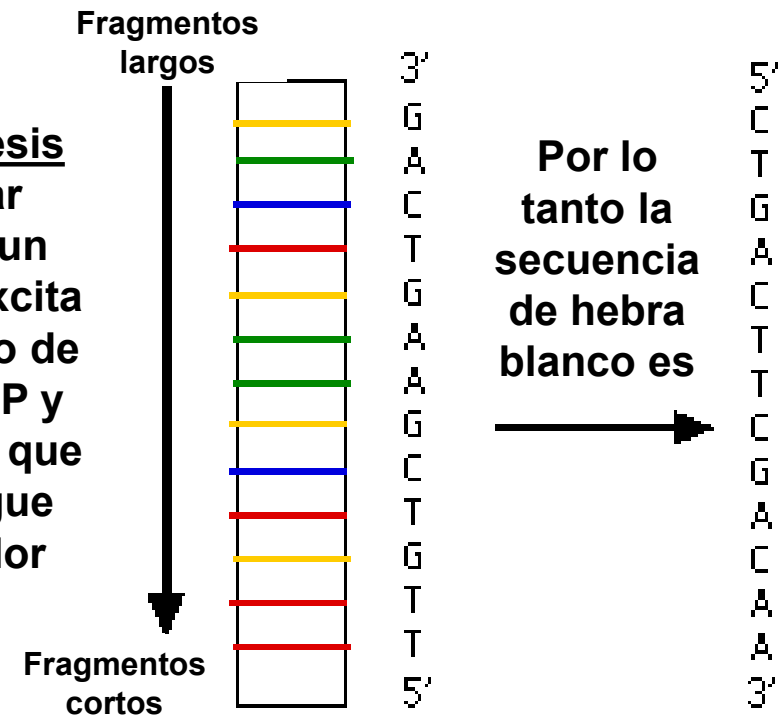


1) Reacción de secuenciación

2) Electroforesis y detección de los diferentes fragmentos de ADN simple hebra generados

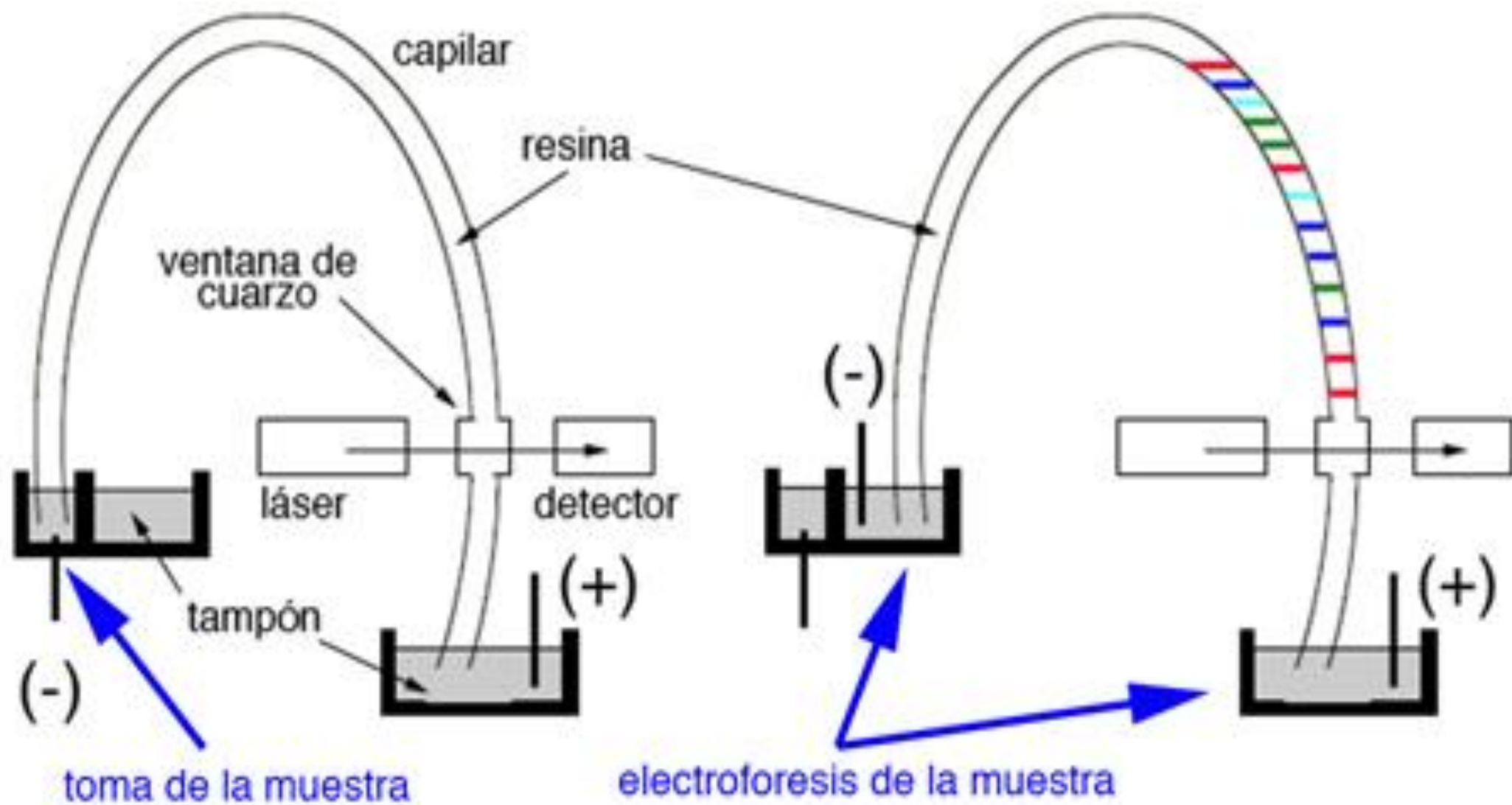
2)

Electroforesis en capilar acoplado un laser que excita el fluoróforo de cada ddNTP y un detector que los distingue por su color emitido

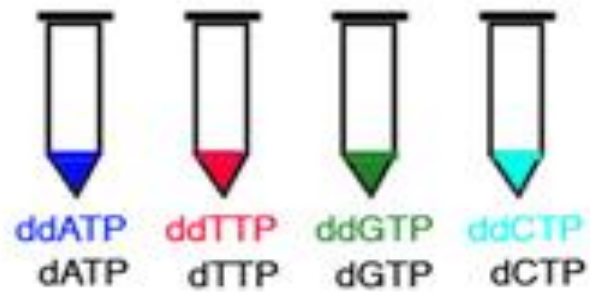


Se puede obtener la secuenciar de fragmentos de hasta **600 pb** de longitud en una única reacción de secuenciación (corrida).

Secuenciación de Sanger



Secuenciación de Sanger

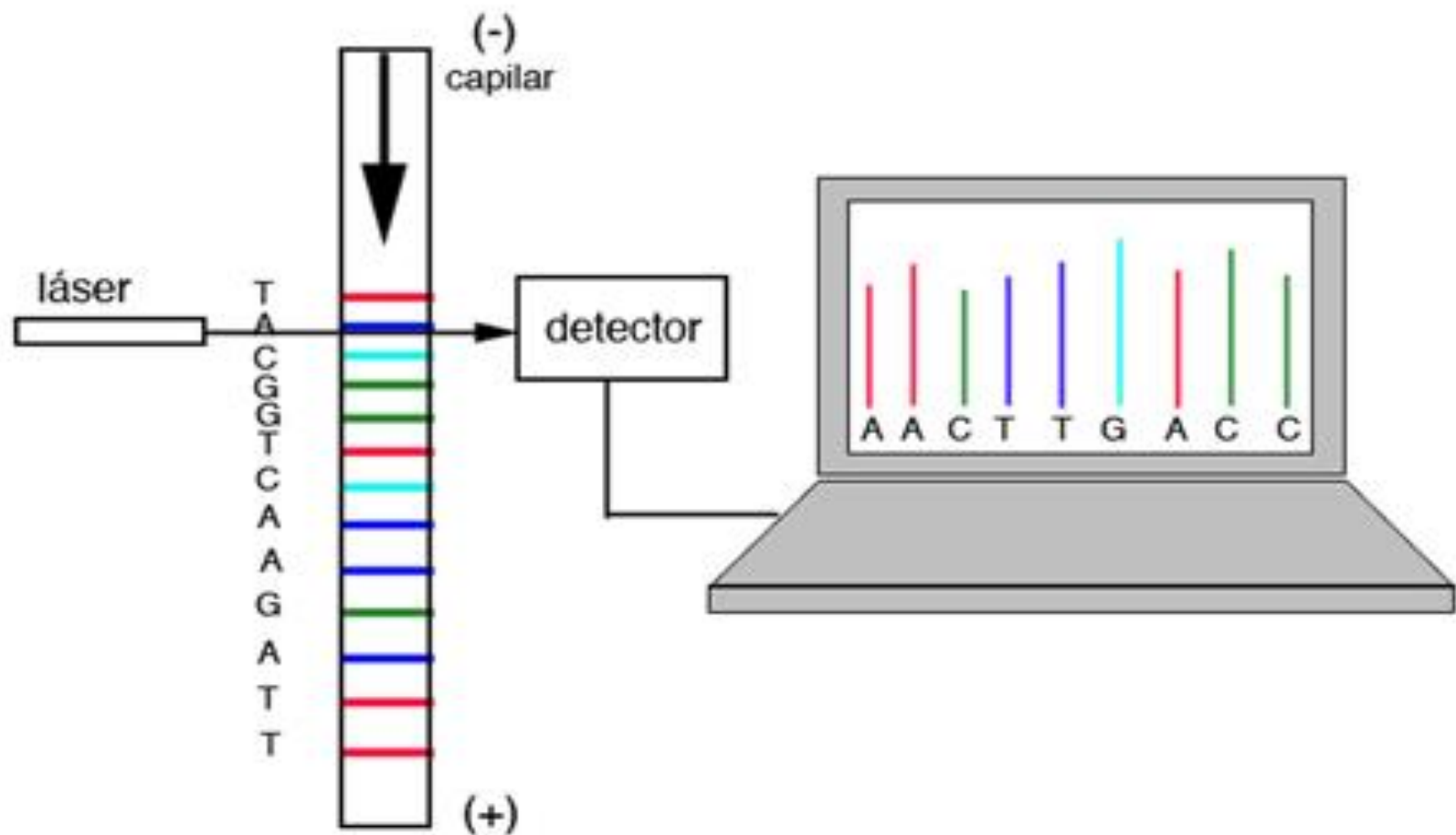


5' cebador + 1 T
3' AATCTTGACCGTA

5' cebador + 2 TT
3' AATCTTGACCGTA

5' cebador + 3 TTA
3' AATCTTGACCGTA

5' cebador + 4 TTAG
3' AATCTTGACCGTA



The Nobel Prize in Chemistry 1958



Frederick Sanger

Prize share: 1/1

The Nobel Prize in Chemistry 1958 was awarded to Frederick Sanger *"for his work on the structure of proteins, especially that of insulin"*.

The Nobel Prize in Chemistry 1980



Paul Berg

Prize share: 1/2



Walter Gilbert

Prize share: 1/4



Frederick Sanger

Prize share: 1/4

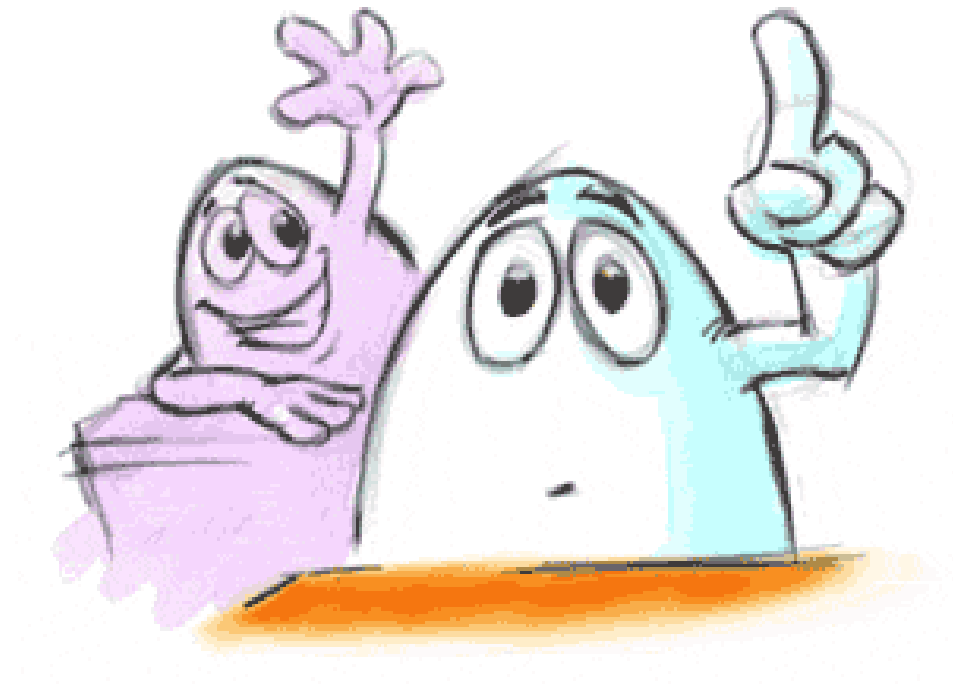
The Nobel Prize in Chemistry 1980 was divided, one half awarded to Paul Berg *"for his fundamental studies of the biochemistry of nucleic acids, with particular regard to recombinant-DNA"*, the other half jointly to Walter Gilbert and Frederick Sanger *"for their contributions concerning the determination of base sequences in nucleic acids"*.

Junto con **Marie Curie** (física y química), **John Bardeen** (física) y **Linus Pauling** (química y paz), las únicas 4 personas que han ganado el premio Nobel 2 veces.

Video explicativo del método de secuenciación de ADN por Sanger:

<http://www.youtube.com/watch?v=NEu0mO-2ras>

MUCHAS GRACIAS POR SU ATENCIÓN!



PREGUNTAS ??

Secuenciación de ADN

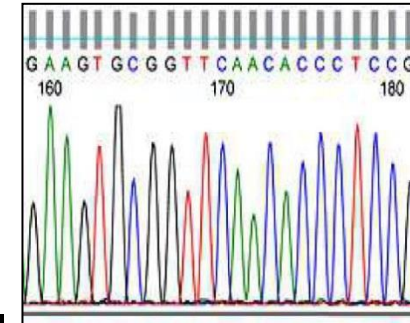
ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Secuencias nucleotídicas, o secuencias aminoacídicas inferidas.

- ➡ Buscar homologías y confirmar diagnóstico de agente etiológico.**
- ➡ Inferir relaciones filogenéticas.**
- ➡ Inferir relaciones filodinámicas (fiologeografía).**
- ➡ Epidemiología molecular.**
- ➡ Detectar eventos de recombinación homologa (ej: entre genotipos de un mismo virus).**
- ➡ Inferir estructura tridimensional y función de proteínas.**
- ➡ etc...**

Análisis filogenéticos

Etapas de la filogenia molecular:



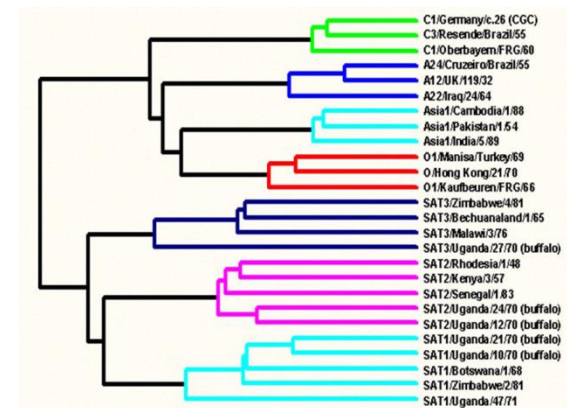
1) Adquisición y edición de las secuencias.

2) Alineamiento de las secuencias.

#	Name	&	105	110	115	120
1	O101.Oacu.tnrf		GG	T	G	A
2	O102.Oacu.tnrf		GG	T	G	A
3	O104.Oacu.tnrf		GG	T	G	A
4	O105.Oacu.tnrf		GG	T	G	A
5	O106.Oacu.tnrf		GG	T	G	A
6	O107.Oacu.tnrf		GG	T	G	A
7	O108.Oacu.tnrf		GG	T	G	A
8	O109.Oacu.tnrf		GG	T	G	A
9	O110.Oacu.tnrf		GG	T	G	A
10	O111.Uori.tnrf		GG	T	G	A
11	O112.Uori.tnrf		GG	T	G	A
12	O113.OQc.tnrf		GG	T	G	A
13	O114.Uor2.tnrf		GG	T	G	A
14	O115.OQc.tnrf		GG	T	G	A
15	O116.Uoru.tnrf		GG	T	G	A
16	O117.Uoru.tnrf		GG	T	G	A
17	UC0702.Nob.tnrf		GG	T	G	A
18	UC1163.Sehn.tnrf		GG	T	G	A
19	UC1164.Sehn.tnrf		GG	T	G	A
20	UC1164.Sehn.tnrf		GG	T	G	A
21	UC1166.Nob.tnrf		GG	T	G	A
22	UC1168.Ston.tnrf		GG	T	G	A
23	UC1180.Ston.tnrf		GG	T	G	A
24	UC1219.Ngyn.tnrf		GG	T	G	A
25	UC1219.Ngyn.tnrf		GG	T	G	A
26	UC1219.Ngyn.tnrf		GG	T	G	A
27	R003.Osea.tnrf		GA	T	G	A

	*	*	**	:	*	*	.
NLTP1 TOBAC	KALVNSARTTEDEQICACTOLKSAZ						
NLTP1 SOLEN	KGLIGSAKITTADRKTTACTCLKSAA						
NLTP BETVU	KLNSLAAPSPADKTKTCTCLKSAA						
NLTP SPIOL	KALNAAAAITTDPEKTATCNLKLSAZ						
NLTP6 GOSHI	RSLKSAARIFLDRCQAACKCKISLA						
NLTP3 LENCUC	KKLLAAAEFTADPRAACANCLKTAA						
NLTP1 ARATH	KNLNSIAKTTETDQQQCNCNTGGAZ						
NLTP1 BRANA	TNLNNMKAITTEDRQQACRCIVGAZ						
NLTP1 SORBI	RSLNSAARITADPFAACANCLKNNA						
NLTP1 ORYSJ	RSLKKAASATTDABEFTATCNCLKNNA						
NLTP1 HORVU	RELHNQAQSSGGDRQTVCNCLKGIA						
SCA LILLO	RTLNNLAKITTEDROTCAENCLKSLW						

3) Reconstrucción del árbol filogenético.



Hibridación de los ácidos nucleicos

FUNDAMENTO:

➡ Se basa en la capacidad que poseen los ácidos nucleicos de *hibridarse entre si*, es decir, en la complementariedad de las bases que lo componen.

➡ Dos técnicas para identificación de ác. Nucléicos:

- *Southern blot* (ADN)
- *Northern blot* (ARN)

Hibridación de los ácidos nucleicos

METODOLOGIA:

Partimos de un gel de electroforesis, desde donde quiero detectar la secuencia blanco.



Se diseña una sonda (secuencia de ADN complementaria a la que quiero detectar).



Se marca con un fluoróforo o isótopo radiactivo.

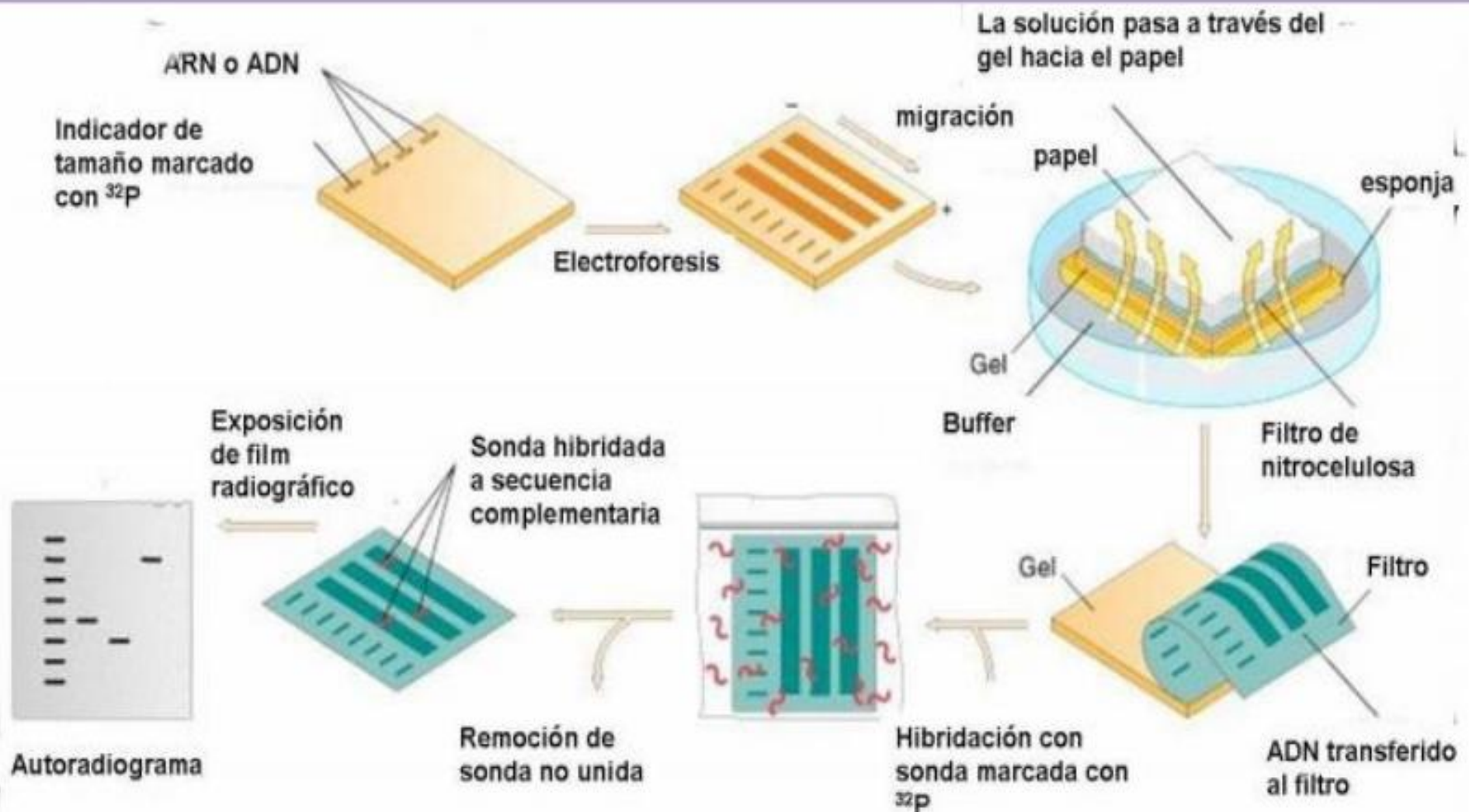


Se realiza la hibridación de la sonda con la secuencia específica a detectar.



Detección del marcaje: autoradiografía (isótopo radiactivo) o reacción química luminiscente (fluoróforo).

Hibridación de los ácidos nucleicos



Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

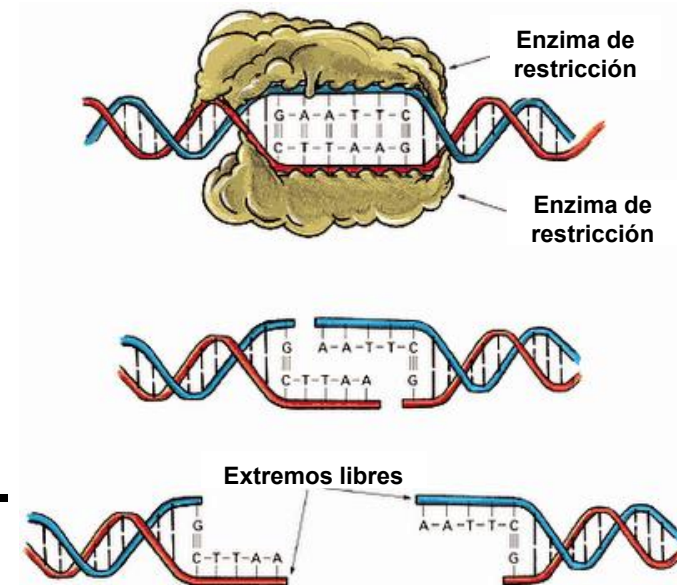
RFLP = Restriction Fragment Length Polymorphism

FUNDAMENTO:

➔ Identificación de polimorfismos en una secuencia de ADN mediante el uso de *enzimas de restricción*.

➔ Enzimas de restricción (Endonucleasas):

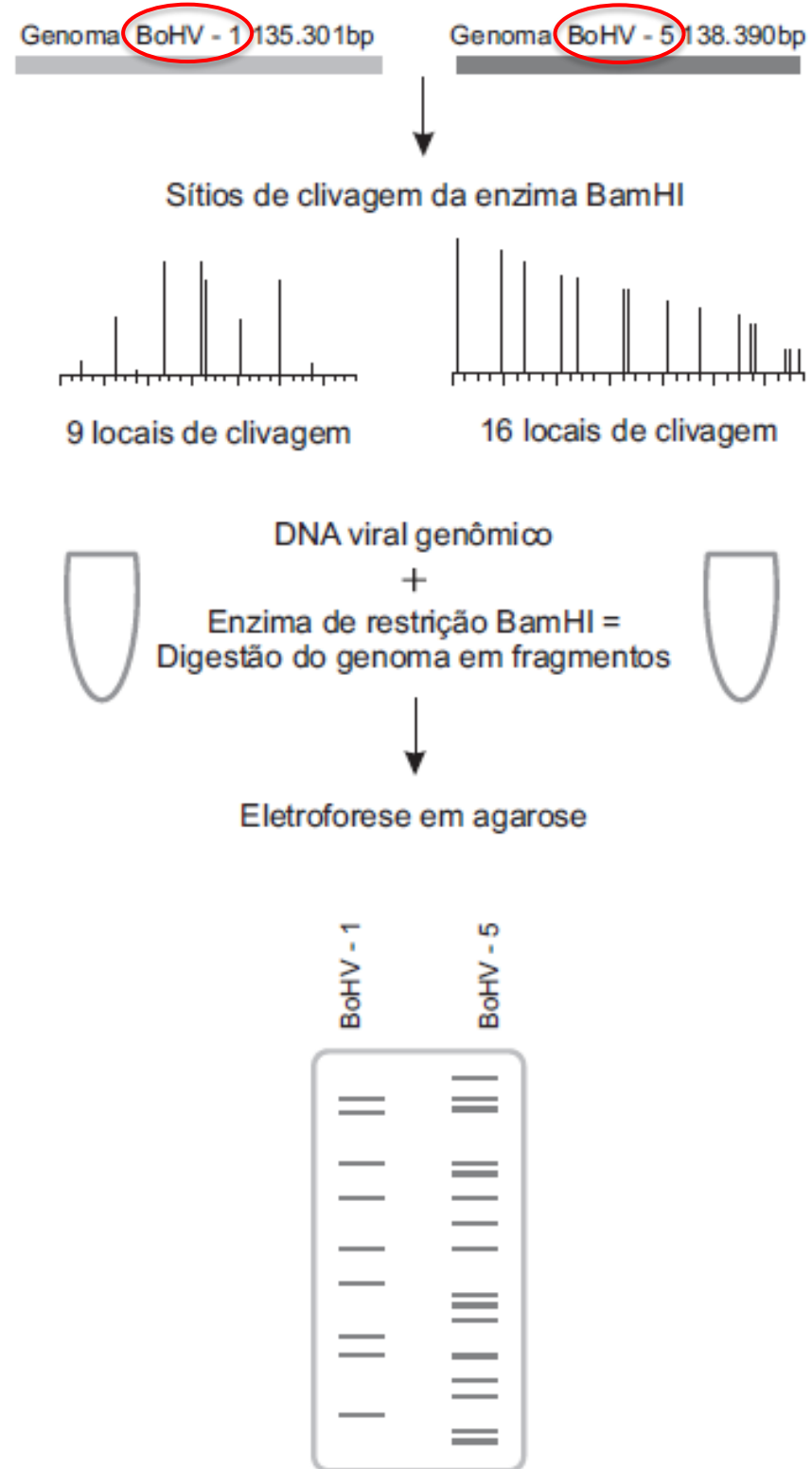
- Reconocen secuencias específicas del ADN y cortan en sitios determinados (4-5 nucleótidos).
- Se generan fragmentos de distintas longitudes dependiendo del tipo viral que se encuentra en la muestra (por variabilidad genética).



RFLP

METODOLOGÍA:

- ➔ Generalmente partimos del producto de la PCR (amplificación fragmento gen de interés)
- ➔ Se divide el producto en tantos tubos como enzimas vayamos a utilizar
- ➔ Visualización de los productos de la digestión mediante electroforesis.
- ➔ Análisis de los resultados por electroforesis.



APLICACIONES

➡ *Gentotipificación:*

- Determinar genotipos/s de un virus en una muestra**
- ➡ Selección genética (detectar alelos favorables para un carácter)**
- ➡ Estudio de enfermedades genéticas (detección de mutaciones)**

Bibliografía

Eduardo Furtado Flores
(ORG.)

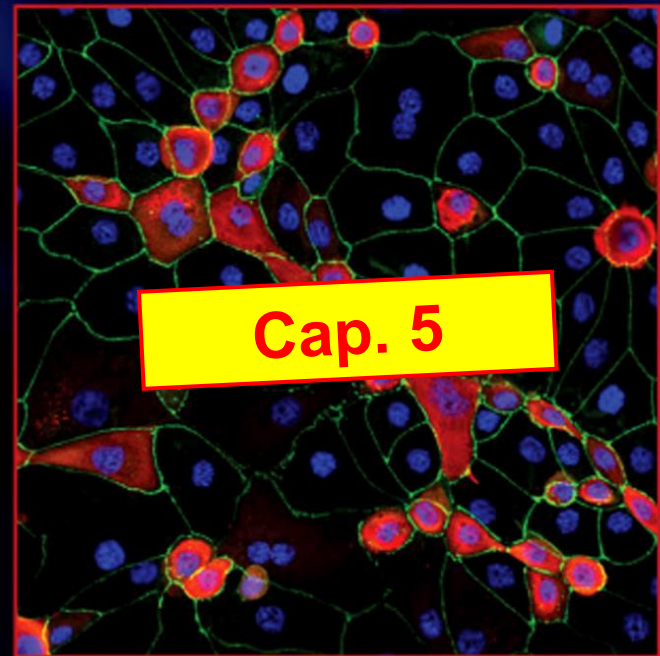
VIROLOGIA VETERINÁRIA

Cap. 3 y 11

editora **ufsm**
Santa Maria, 2007

FOURTH EDITION

FENNER'S VETERINARY VIROLOGY



EDITED BY
N. James MacLachlan & Edward J. Dubovi

CONTRIBUTORS
Stephen W. Barthold, Richard A. Bowen, Ronald P. Hedrick, Donald P. Knowles,
Michael D. Lairmore, Colin R. Parrish, Linda J. Saif and David E. Swayne

Extra!

Ejemplo: PCR semi-anidada Multiple para diagnóstico de Rotavirus

RVA

**Multiplex Semi-Nested
PCR : G- y P-tipos**

*Gentsch et al. 1992;
Das et al. 1994; Fischer et
al., 2000; WHO, 2009*

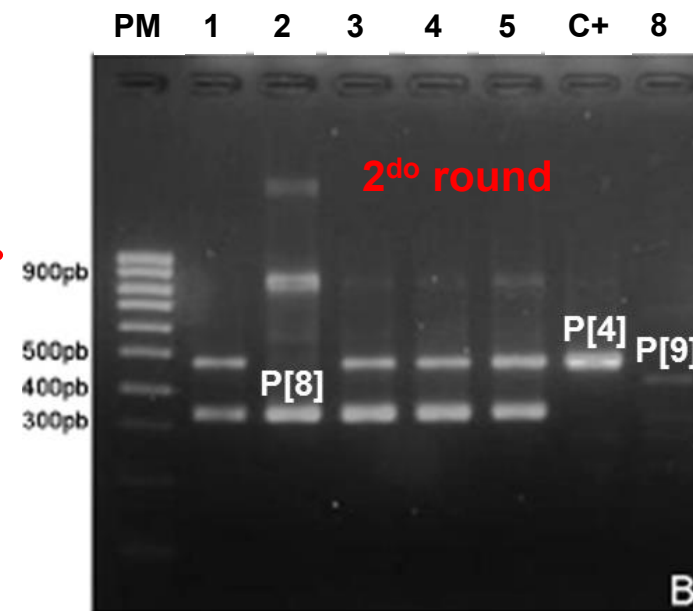
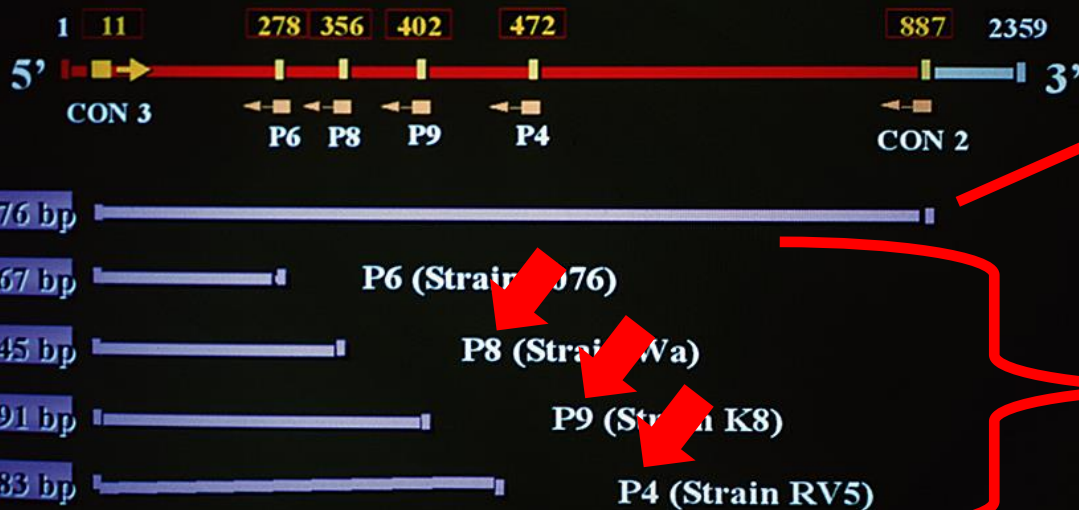
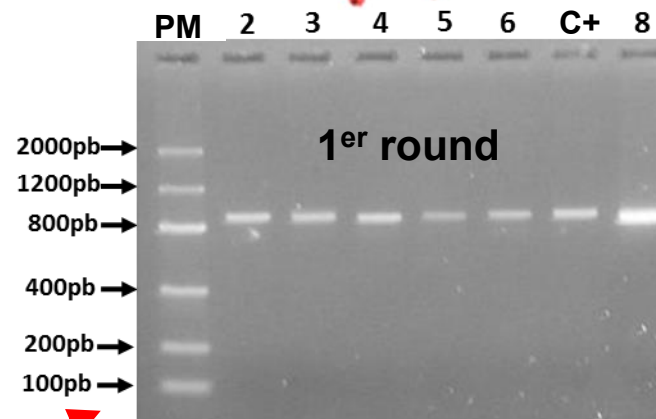
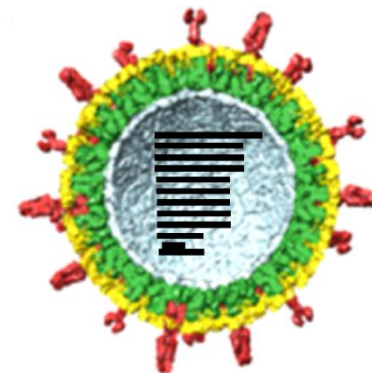
VP4

VP6

VP7

**P-Tipos
(47)**

**G-Tipos
(32)**



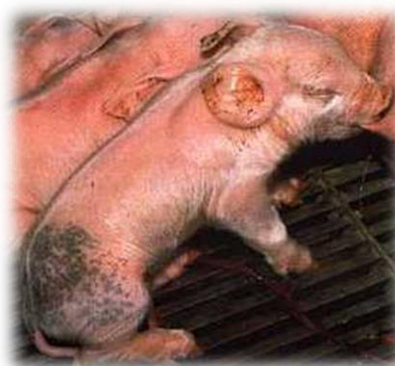
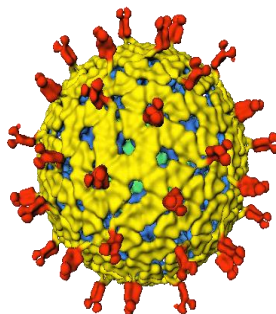
Extra!

Diarrea por Rotavirus (RV) en especies animales de interés económico para Argentina



G6P[5] G10P[11]
G15P[11] G8P[11]

Garaicoechea, et al, 2006
Badaracco, et al, 2011



G4P[6] G6P[1]
G8P[6]

Parra et al, 2008



G3P[12] G14P[12]
G3P[3]

Garaicoechea, et al, 2006
Miño, et al, 2011



Guanacos

G8P[1] G8P[14]

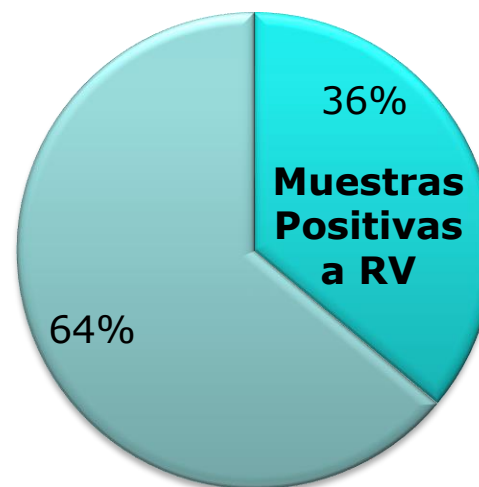
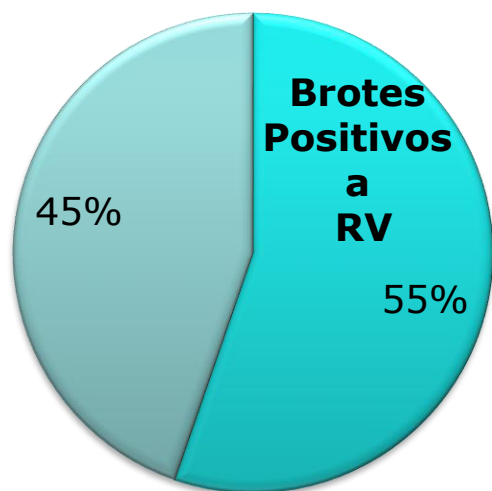
Parreño, Bok, et al, 2004



Extra!

Epidemiología RV en Bovinos (RVB) en Argentina

Año	Nro de brotes (muestra)	Incidencia de RV en brotes %	Incidencia de RV en muestras %	% RV de acuerdo al tipo de explotación		
				Cría	Tambo	ND
2008	17(142)	82%(14/17)	23%(32/142)	100%(1/1)	79%(11/14)	100%(2/2)
2009	13(106)	77%(10/13)	36%(38/106)	100%(1/1)	88%(7/8)	50%(2/4)
2010	16(149)	50%(8/16)	23%(35/149)	33%(1/3)	58%(7/12)	0%(0/1)
2008-2010	46(397)	70%(32/46)	26%(105/397)	60%(3/5)	74%(25/34)	57%(4/7)
1994-2007	777 (2646)	54% (423/777)	38% (993/2646)	64%(213/331)	50% (78/157)	46% (134/289)
Total	823	55%	36%	64%	54%	47%
1994-2010	(3043)	(455/823)	(1098/3043)	(216/336)	(103/191)	(138/296)



Extra!

Detección de Rotavirus Bovino del Grupo A (RVA) en rodeos argentinos (1994 – 2010)

Total de brotes: 823 (3043 muestras)

Cría n= 336 brotes

Tambo n=191 brotes

Tasa de detección de RVB según
Tipo Explotación

CRÍA	64% (216/336) *
TAMBO	54 % (103/191)

Chi-Sq $p=0.0193$

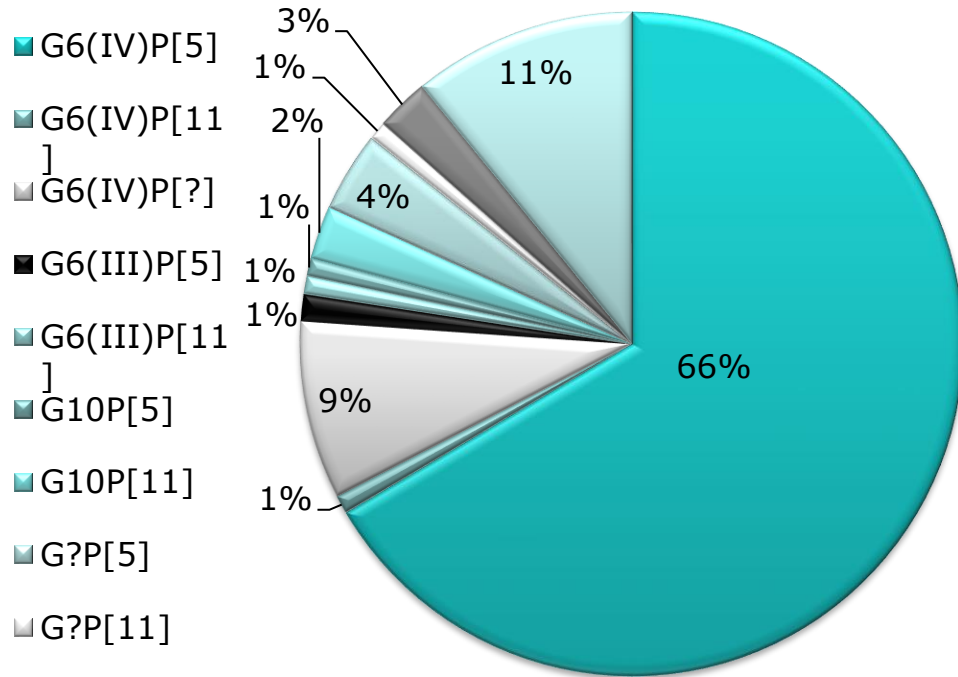
ND n= 296 brotes!



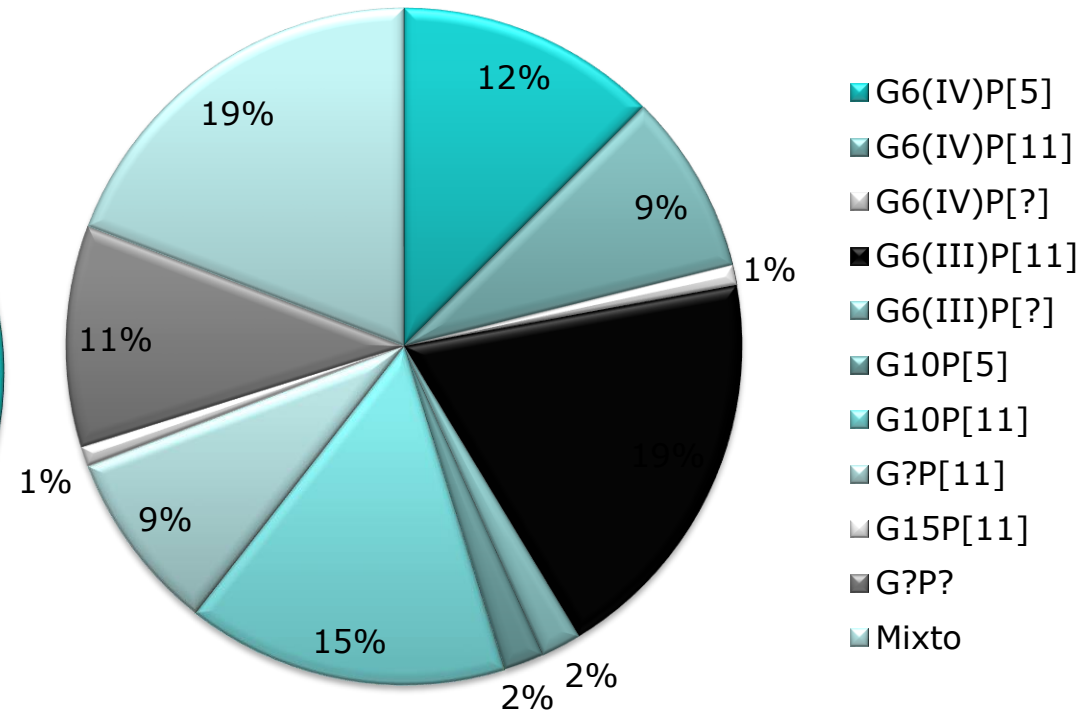
Extra!

Caracterización de las cepas de RVA (1994-2010) Epidemiología según el tipo de explotación

RODEOS DE CRIA
n=216 Brotes positivos a RVB



TAMBO
n=103 Brotes positivos a RVB



Garaicoechea L., et. al. 2006.. *Veterinary Microbiology* 118: 1–11

Badaracco , A. y col, *Vet. Microbiology* 2011 en prensa