



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Ciencias Biológicas

Unidad de Posgrado

**Caracterización molecular de los virus del grupo C
(género *Ortobunyavirus*), aislados en el Perú**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

AUTOR

Roger Melvin CASTILLO ORÉ

ASESOR

Pablo Sergio RAMÍREZ ROCA

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Castillo, R. (2018). *Caracterización molecular de los virus del grupo C (género Ortobunyavirus), aislados en el Perú*. [Tesis de doctorado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrado]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



VICEDECANATO DE INVESTIGACION Y POSGRADO

UNIDAD DE POSGRADO

Acto seguido el Jurado procedió a la votación la que dio como resultado el calificativo de: *Muy Bueno con la nota de 17*

A continuación la Presidente del Jurado Examinador recomienda que la Facultad proponga que la Universidad le otorgue el grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas al Magíster *Roger Melvin Castillo Ore*

Siendo las *16:30* se levantó la Sesión, recibiendo el graduando las felicitaciones de los señores miembros del Jurado y público asistente.

Se extiende la presente Acta en Lima, el día 09 del mes de octubre del año 2018.

Dra. Egma M. Mayta Huatuco
Profesora Principal a D. E.
PRESIDENTE

Dr. Pablo S. Ramírez Roca
Profesor Principal a D.E.
ASESOR

Dr. Armando Yarleque Chocas
Profesor Principal a T. C.
MIEMBRO

Dr. Enrique W. Mamani Zapana
Profesor Auxiliar a T.P.
MIEMBRO

Dr. Juan A. Jiménez Chunga
Profesor Asociado a T.C.
MIEMBRO

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar la tesis doctoral, mi mente remonta todo el camino tomado para la ejecución del presente trabajo, lleno de retos, iniciando con el desarrollo experimental, donde me encontré con varios problemas que querían apagar mi ímpetu, pero finalmente fueron resueltos y cuando ya empezaba a ver la luz al final, otro gran obstáculo se presentó, la redacción de la tesis; tal vez, para cualquier persona hubiese sido sencilla, pero a veces existe ese “no sé qué” que siempre te detiene y te pone en pausa, pero con mucha decisión también fue vencido. Finalmente, cuando terminas, te dices a ti mismo, “lo logré”. Pero el análisis objetivo, te muestra que no es solo un logro personal y no hubiese podido ser posible sin la intervención o ayuda de; primeramente, Dios, luego, de un gran grupo humano, que de algún modo cooperó en algo del proceso para llegar a un feliz término.

Por ello, para mí, es un verdadero placer tener este espacio y poder expresar mi gratitud y agradecimiento en primer lugar a Dios, luego a ese gran grupo humano empezando por mis supervisoras; Carolina Guevara por apoyarme en el tema propuesto, Maria Silva, por darme las facilidades para el desarrollo de la tesis y su insistencia en la redacción final. A mi gran amigo, Brett Forshey, quien aportó grandemente en todo el proceso de la publicación del manuscrito. A la doctora Julia Ampuero por su continua insistencia en la finalización de tesis. A la Sra. Roxana Cáceda por su invaluable apoyo en los procesos de la microneutralización. A mis grandes amigos Vidal Felices, Alfredo Huaman, Diana Juárez, Julio Evangelista, José Luis Huamán, Juan Sulca, Alicia Rosas, Elizabeth Castillo, Jennifer Zamora, Zonia Ríos, Dina Popuche, Gladys Carrión, Jane Ríos, Angelica Espinoza, Christopher Cruz, Patricia Galván, Victoria Espejo y María Esther Gamero por su gran compañerismo.

El presente trabajo ha sido financiado por el “*Armed Forces Health Surveillance Center, Global Emerging Infections Surveillance and Response System*” (AFHSC-GEIS), unidad de trabajo número: 847705.82000.25GB.B0016.

DEDICATORIA

La presente tesis la dedico a Dios, mis padres Grimalda Oré y Juan de Dios Castillo, mi esposa Maribel, mis hijas Alexia y Sandra, al resto de mi familia no mencionada en el presente y mis amigos.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Arbovirus	3
2.2 Bunyavirus	4
2.3 Orthobunyavirus	6
2.4 Virus del grupo C	7
2.4.1 Generalidades	7
2.4.2 Distribución geográfica	9
2.4.3 Sistema de clasificación	9
2.4.4 Ciclos de transmisión y hospederos	11
2.4.5 Infección en humanos	14
2.4.6 Diagnóstico	14
2.4.7 Características físicas del virus	15
2.4.8 Características genéticas	16
3. HIPÓTESIS	20
4. OBJETIVOS	20
4.1 Objetivo general	20
4.2 Objetivos específicos	20
5. MATERIALES Y MÉTODOS	21
5.1 Muestra	21
5.2 Población involucrada en el estudio	21
5.3 Aislamiento viral	22
5.4 Caracterización genómica	23
5.4.1 Diseño de <i>primers</i>	23
5.4.2 Extracción de RNA viral	24
5.4.3 Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	25
5.4.4 Electroforesis	25
5.4.5 Purificación del DNA amplificado	26

5.4.6 Secuenciación -----	28
5.4.7 Análisis de las secuencias y filogenia -----	29
5.5 Análisis antigénico -----	30
5.5.1 Preparación de antisueros -----	30
5.5.2 Prueba de microneutralización (MNT) en cultivo celular ---	31
5.5.3 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) ---	32
6. RESULTADOS Y DISCUSIONES -----	33
6.1 Población involucrada en el estudio -----	33
6.2 Diseño de <i>primers</i> -----	37
6.3 Retro transcripción y amplificación de DNA complementario -----	42
6.4 Secuenciación y análisis filogenético -----	44
6.4.1 Análisis de las secuencias del segmento genómico S -----	46
6.4.2 Análisis de las secuencias del segmento genómico M -----	50
6.4.3 Análisis de las secuencias del segmento genómico L -----	53
6.5 Análisis antigénico -----	56
6.5.1 Microneutralización (MNT) -----	56
6.5.2 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) ---	59
6.6 Caracterización de los virus del grupo C aislados -----	61
7. CONCLUSIONES -----	64
8. RECOMENDACIONES -----	65
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	66
10. ANEXOS -----	74
11. PRODUCTIVIDAD CIENTÍFICA -----	76

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Vectores y hospederos de los virus del grupo C -----	13
Tabla 2. Cepas referenciales de Orthobunyavirus del grupo C (GRCV) usados en el estudio -----	23
Tabla 3. Principales manifestaciones clínicas de los pacientes infectados con virus del grupo C -----	35
Tabla 4. Datos demográficos de los pacientes infectados con virus del grupo C y año de aislamiento -----	36
Tabla 5. <i>Primers</i> diseñados para virus del grupo C -----	38
Tabla 6. Lista de aislamientos de GRCV y número de ingreso al GenBank ----	45
Tabla 7. Porcentaje de identidad en base a secuencias de nucleótidos y aminoácidos del segmento genómico S, de algunos aislamientos y virus referenciales del grupo C -----	49
Tabla 8. Porcentaje de identidad en base a secuencias de nucleótidos y aminoácidos del segmento genómico M, de algunos aislamientos y virus referenciales del grupo C -----	52
Tabla 9. Porcentaje de identidad en base a secuencias de nucleótidos y aminoácidos del segmento genómico L, de algunos aislamientos y virus referenciales del grupo C -----	55
Tabla 10. Títulos de microneutralización de los virus del grupo C aislados y referenciales enfrentados contra los anticuerpos (HMAF) preparados con cepas referenciales -----	57
Tabla 11. Relación de MNT y anticuerpos tipo IgM detectados por ELISA en muestras convalecientes de los pacientes aislados el virus del grupo C -----	60

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Localización del área de estudio de los primeros aislamientos de los virus del grupo C. Belén, estado de Para, Brasil -----	8
Figura 2. Relación serológica entre los distintos virus del grupo C -----	10
Figura 3. Ciclo de transmisión de los virus del grupo C -----	11
Figura 4. Orthobunyavirus -----	16
Figura 5. Ubicación de los NTRs y la estrategia de expresión -----	17
Figura 6. Estrategias de codificación de los segmentos genómicos -----	19
Figura 7. Distribución de las muestras de pacientes febriles en Perú -----	34
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR del segmento genómico S de GRCV ensayados con los <i>primers</i> diseñados -----	39
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR del segmento genómico M de GRCV ensayados con los <i>primers</i> diseñados -----	40
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR del segmento genómico L de GRCV ensayados con los <i>primers</i> diseñados -----	41
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR del segmento genómico S de algunos GRCV -----	43
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR de los segmentos genómicos M y L de algunos GRCV -----	44
Figura 13. Análisis filogenético de secuencias parciales del segmento	

genómico S de GRCV -----	48
Figura 14. Análisis filogenético de secuencias parciales del segmento genómico M de GRCV -----	51
Figura 15. Análisis filogenético de secuencias parciales del segmento genómico L de GRCV -----	54

ABREVIATURAS

A	- Amperios
Aa	- Aminoácido
ABTS	- <i>2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)</i> . Sustrato para pruebas de ELISA que usan peroxidasa
APEUV	-Virus Apeu
BEI	- Etilen imino binario
CARV	- Virus Caraparu
°C	- Grados Celsius
cDNA	- Ácido desoxirribonucleico complementario
CF	- Fijación del complemento
CO ₂	- Gas carbónico
CPE	- Efecto citopático
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
dNTP	- Desoxi nucleótidos trifosfatados
DTT	- Dithiothreitol
ELISA	- Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
E-MEM	- Medio mínimo esencial con sales de Eagle
FICT	- Isotiocianato de fluoresceína
GRCV	- Orthobunyavirus del grupo C
HI	- Inhibición de la hemaglutinación
HMAF	- Fluido ascítico hiper inmune de ratón
IP	- Intraperitoneal

ITQV	- Virus Itaqvi
kDa	- Kilodaltons
MADV	- Virus Madrid
mg	- Miligramo
min	- Minuto
mL	- mililitro
mM	- Milimolar
MNT	- Prueba de microneutralización
MTBV	- Virus Madrid
MURV	- Virus Murutucu
N	- Nucleocápside
nm	- Nanómetros
NT	- Neutralización
nt	- Nucleótido
ORIV	- Virus Oriboca
pb	- Pares de bases
PBS	- Buffer fosfato salino
PCR	- Reacción en cadena de la polimerasa
RNA	- Ácido ribonucleico
RPM	- Revoluciones por minuto
SBF	- Suero Bovino Fetal
SC	- Subcutánea
ssRNA	- Ácido ribonucleico de cadena simple

TBE	- Tris/Borato/EDTA
TCID50	- Dosis infectiva en cultivo celular 50%
μL	- Microlitro
μM	- Micro molar
V	- Voltios
x g	- Gravedades

RESUMEN

Los virus del grupo C (GRCV) son un complejo que pertenecen al género *Orthobunyavirus*, de la familia *Peribunyaviridae* (anteriormente denominado *Bunyaviridae*). Estos virus están asociados con enfermedades febriles en humanos que generalmente habitan en áreas tropicales y subtropicales de América del Sur y América Central. A pesar de que muchos GRCV han sido aislados de mosquitos, animales y seres humanos, los análisis genéticos de estos virus aún son limitados. En el Perú, el centro de investigaciones de enfermedades tropicales de la marina de los Estados Unidos (NAMRU-6) viene conduciendo desde los años noventa una vigilancia pasiva de las enfermedades febriles. Durante este tiempo, se lograron recuperar e identificar mediante la prueba de inmunofluorescencia 65 aislamientos de GRCV de pacientes febriles habitantes del norte y sur de la Amazonía peruana. Para caracterizar estos aislamientos, se secuenciaron una región de 500 pb del segmento S y una región de 750 pb de los segmentos M y L. El análisis de la secuencia de los aislamientos clínicos mostró identidades de nucleótidos que oscilaban entre el 68% y el 100% y las identidades de secuencia de aminoácidos deducidas que oscilaban entre 72% y 100%. Las secuencias se compararon con las siguientes cepas referenciales: virus Caraparu (CARV), virus Murutucu (MURV), virus Oriboca (ORIV), virus Marituba (MTBV), virus Apeu (APEUV) y virus Madrid (MADV). La comparación de secuencias de los segmentos L y S de las cepas clínicas con cepas referenciales mostró dos clados; clado I formado por aislamientos con alta correlación con CARV-MADV y clado II conformado por aislamientos con alta correlación con MURV, ORIV, APEUV y MTBV. Las secuencias del segmento M contiene algunos aislamientos de GRCV diferentes filogenéticamente a los de segmento L y S y su distribución filogenética está altamente relacionada con la microneutralización serológica. Estos resultados demuestran las relaciones genéticas y serológicas de los GRCV que circula en la Amazonía peruana y la divergencia genética de los GRCV en el norte de la Amazonía.

Palabras clave: Arbovirus, Bunyavirus, grupo C virus, Orthobunyavirus, Perú.

ABSTRACT

Group C Orthobunyaviruses (GRCVs) are a complex of viruses in the genus Orthobunyavirus, family Peribunyaviridae (formerly named Bunyaviridae). These viruses are associated with human febrile disease in tropical and subtropical areas of South and Central America. While numerous GRCVs have been isolated from mosquitoes, animals, and humans, genetic analysis of these viruses is limited. Since the 1990s, the Naval Medical Research Unit Six (NAMRU-6) has conducted passive surveillance for febrile disease in Peru. During this time, 65 isolates from febrile patients in the northern and southern Peruvian Amazon were identified as GRCVs using an immunofluorescent assay. To further characterize these isolates, a 500 bp region of the S segment and 750 bp region of the M and L segments were sequenced. Pairwise sequence analysis of the clinical isolates showed nucleotide identities ranging from 68% to 100% and deduced amino acid sequence identities ranging from 72% to 100%. Sequences were compared with reference strains of the following GRCVs: Caraparu virus (CARV), Murutucu virus (MURV), Oriboca virus (ORIV), Marituba virus (MTBV), Apeu virus (APEUV), and Madrid virus (MADV). Sequence comparison of the segments L and S from clinical isolates with the prototype strains showed two clades; clade I conformed by isolations with high correlation with CARV-MADV and clade II conformed by isolations with high correlation with MURV, ORIV, APEUV, and MTBV. Sequences of the segment M have some GRCV isolates out of the segment L and S phylogenetic groups and the phylogenetic distribution of this segment (M) are highly related with the serologic-microneutralization. These results demonstrate the genetic and serologic relationships of GRCVs circulating in the Peruvian Amazon and the genetic divergence of GRCVs within the northern Amazon.

Key Word: Arbovirus, Bunyavirus, group C virus, Orthobunyavirus, Peru

1. INTRODUCCIÓN

Los virus del grupo C (GRCV) pertenecen taxonómicamente al género *Orthobunyavirus* que a su vez agrupa varios virus de importancia clínica, generalmente son transmitidos a través de mosquitos como vectores, por ello son un complejo muy importante dentro del gran grupo ecológico denominado arbovirus.

El término arbovirus fue propuesto en 1958 en una discusión en Lisboa y aceptado desde entonces a nivel mundial para agrupar virus transmitidos por artrópodos (del inglés *arthropod borne viruses*) (Calisher, 2013). Actualmente los arbovirus son aquellos virus que se mantienen en la naturaleza por transmisión biológica entre hospederos vertebrados susceptibles mediante artrópodos hematófagos. Se conocen a más de 130 arbovirus asociadas como causantes de enfermedades en humanos y la mayoría de los arbovirus de importancia para la salud pública pertenecen taxonómicamente a uno de los tres géneros virales: *Flavivirus*, *Alphavirus* y *Orthobuntavirus*.

El género *Orthobunyavirus* agrupa virus con características estructurales y genéticas similares, pero con tendencias serológicas diferentes, es decir podemos agruparlos en diferentes complejos serológicos. Muchos *Orthobunyavirus* están relacionados con casos de enfermedades en humanos en distintas partes del mundo, entre ellos los más importantes destacan los virus de los grupos serológicos: simbu, bunyamwera, california y grupo C.

Los GRCV han sido aislados por primera vez en la región amazónica del Brasil en la década de 1950 (Casals y Whitman, 1961), desde entonces se han aislado numerosos GRCV a partir de muestras tomadas de animales, mosquitos y humanos. Con el propósito de clasificarlos han sido agrupados en un total de 4 complejos antigénicos (complejo Caraparu, Madrid, Marituba y el complejo Oriboca) (Nunes y col., 2005).

En el Perú, se han documentado los primeros aislamientos de GRCV en estudios hechos en los años 1970 y 1971, en la región amazónica, cerca de la ciudad de Iquitos; donde obtuvieron 11 aislamientos usando animales centinela y 3

aislamientos de mosquitos capturados; los cuales fueron identificados mediante pruebas serológicas como: Caraparu-Ossa virus (9 aislamientos), Marituba (4 aislamientos) y Oriboca-Itaqui (1 aislamiento) (Scherer y col., 1975). Años posteriores, se reportan 30 aislamientos de GRCV asociadas a infecciones en humanos, ocurridos durante los años 2000 al 2007; de los cuales 9 provienen de Puerto Maldonado, 18 de Iquitos y 3 de Yurimaguas (Forshey y col., 2010). Además, la existencia de otros aislamientos asociados a infecciones de GRCV no reportados, refuerzan la necesidad de hacer estudios de caracterización genética con el fin de conocer su distribución, clasificación y tendencias ecológicas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Arbovirus

El nombre de arbovirus es un acrónimo derivado de las palabras en inglés *arthropod borne virus*, propuesta, para agrupar en un campo de estudio, aquellos virus transmitidos a través de vectores artrópodos hematófagos (mosquitos, garrapatas y flebótomos) a hospederos susceptibles (Calisher, 2013). Cabe mencionar que el término es más ecológico que taxonómico, es decir están agrupados más en función a su virtud de sus características biológicas (Calisher y col., 1999). En ese sentido los arbovirus pueden y deben replicarse en dos diferentes tipos de hospederos; artrópodos, que son poiquiloterms y vertebrados, que son homeoterms. De acuerdo al catálogo internacional de los arbovirus (Karabatsos, 1985), los arbovirus se han reportado en todos los continentes a excepción de la Antártida, distribuidos principalmente en áreas tropicales y sub tropicales. De más de 534 virus registrados, 214 virus son conocidos como arbovirus o probables arbovirus, otros 287 virus son considerados como posibles arbovirus y 33 virus listados como probablemente no arbovirus o definitivamente no arbovirus. Del total de listados, 134 han sido documentados como causantes de enfermedades en humanos (Karabatsos, 1985). Los arbovirus incluyen varios virus de distintos grupos taxonómicos, entre los más importantes para la salud pública están incluidos en los géneros: *Alphavirus* perteneciente a la familia *Togaviridae*; *Flavivirus* perteneciente a la familia *Flaviviridae*; *Phlebovirus*, perteneciente a la familia *Phenuiviridae*; *Orthonairovirus* (antiguamente denominado *Nairovirus*), perteneciente a la familia *Nairoviridae*; *Orthobunyavirus*, perteneciente a la familia *Peribunyaviridae*. Cabe mencionar que los géneros *Phlebovirus*, *Nairovirus* y *Orthobunyavirus* pertenecían hasta el 2015 a la familia *Bunyaviridae*, pero el Comité Internacional en Taxonomía de Virus (de sus siglas en inglés *ICTV*) en su décima edición disponible electrónicamente (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>) modificó la familia *Bunyaviridae* elevándolo a estatus de orden *Bunyavirales* donde sus 5 géneros originales fueron reagrupados en nuevas familias y añadiendo otras 4 para hacer un total de 9 familias (Adams y col., 2017; Gubler, 2002; Weaver y Reisen, 2010).

En el Perú, también, se han reportado la presencia de diferentes arbovirus ubicados taxonómicamente en el nuevo orden *Bunyavirales* y las familias *Flaviviridae* y *Togaviridae*. Muchos de estos reportes han sido asociados con enfermedades en humanos, destacando, en la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus*, el virus dengue (DENV) con sus 4 serotipos, los cuales son los arbovirus de mayor importancia epidemiológica a nivel mundial. En el año 1990 ocurre el primer brote documentado en la ciudad de Iquitos, departamento de Loreto, en la región amazónica del Perú (Phillips y col., 1992), desde entonces se reportan brotes anuales en distintas regiones del país (Cabezas y col., 2015); el virus de la fiebre amarilla (FAV) cuyos reportes asociados datan desde la época colonial, pero el primer aislamiento registrado se logra de un brote ocurrido en la ciudad de Ayacucho en el año de 1977 (Mendez y col., 1984). En la familia *Togaviridae*, género *Alphavirus*, los arbovirus de mayor importancia clínica destacan los virus de la Encefalitis Equina Venezolana (VEEV) y el virus Mayaro (MAYV) (Forshey y col., 2010; Morrison y col., 2008; Tesh y col., 1999; Watts y col., 1988). En el orden *Bunyavirales* destaca el género *Orthobunyavirus* (familia *Peribunyaviridae*), con los virus de Orpouche, Guaroa y grupo C (Aguilar y col., 2010; Forshey y col., 2010; Watts y col., 1997a; Watts y col., 1997b). Además, cabe mencionar que diversos miembros de este nuevo orden (*Bunyavirales*) son una amenaza en áreas tropicales y subtropicales para la salud humana y son considerados como patógenos emergentes (Soldán y González, 2005).

2.2 Bunyavirus

Los bunyavirus, como ya se mencionó, hasta el 2015 estaban clasificados taxonómicamente dentro de una sola familia (familia *Bunyaviridae*) con 4 géneros (*Hantavirus*, *Nairovirus*, *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus* y *Tospovirus*). Actualmente son considerados como un nuevo orden (orden *Bunyavirales*), donde agrupa por sus características genómicas y filogenéticas, aproximadamente 530 miembros distribuidos en 9 familias (*Tospoviridae*, *Hantaviridae*, *Phasmaviridae*, *Phenuiviridae*, *Nairoviridae*, *Fimoviridae*, *Peribunyaviridae*, *Jonviridae*, *Feraviridae*) (Adams y col., 2017; Briese y col., 2016). Este gran grupo reúne virus que infectan plantas, invertebrados y vertebrados; donde solamente miembros de las familias

Hantaviridae, *Phenuiviridae*, *Nairoviridae* y *Peribunyaviridae* han sido asociados con infecciones en humanos.

La familia *Hantaviridae* contiene al género *Orthohantavirus* antiguamente denominado género *Hantavirus*; comprende un gran grupo de virus emergentes, cuyos reservorios naturales son los roedores; los seres humanos pueden infectarse accidentalmente a través de aerosoles de excretas de roedores infectados. La distribución geográfica de estos virus está en directa relación a los hospederos. Alrededor del mundo se han descrito dos grupos de hantavirus, los hantavirus del viejo mundo y los hantavirus del nuevo mundo, las infecciones humanas con este virus están asociadas a dos síndromes importantes, la fiebre hemorrágica con síndrome renal (FHSR) en Eurasia y síndrome pulmonar por hantavirus (SPH) en las Américas (Muranyi y col., 2005; Schmaljohn y Hjelle, 1997), En varios países de América se han logrado aislar numerosos hantavirus tanto en humanos como en reservorios; en el Perú a pesar de haberse registrado casos asociados al virus aún no se ha logrado aislar hantavirus en humanos (Castillo y col., 2012).

La familia *Nairoviridae* contiene al género *Orthonairovirus*, antiguamente denominado género *Nairovirus*; son transmitidos principalmente por garrapatas, afectan cabras y carneros, aunque pueden producir enfermedades severas y fatales en humanos. En nuestra región han sido poco estudiados, sin embargo, se conocen que tienen distribución mundial (Honig y col., 2004).

La familia *Phenuiviridae* contiene a 4 géneros (*Goukavirus*, *Phasivirus*, *Tenuivirus* y *Phlebovirus*) donde el género *Phlebovirus* contiene un gran complejo serológico de Arbovirus, asociados con brotes en diferentes partes del mundo; estos virus son transmitidos principalmente por dípteros de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* de la familia *Psychodidae*. En el Perú se han identificado los virus de Maldonado y Echarate en infecciones asociadas a humanos, ambos comprometidos con el complejo serológico candiru (Palacios y col., 2011).

La familia *Peribunyaviridae* contiene dos géneros: género *Herbevirus*, grupo muy emparentado a los *Orthobunyavirus* y hasta al momento solamente asociado a infecciones en insectos (Jungle, 2016) y al género *Orthobunyavirus*, que agrupa el más amplio complejo serológico de arbovirus identificados a nivel mundial, todos

agrupados en base a su relación serológica y molecular, con más de 172 virus clasificados en 18 serogrupos (Soldán y González, 2005).

2.3 Orthobunyavirus

Tradicionalmente los *Orthobunyavirus* han sido clasificados por pruebas serológicas, de las cuales, las pruebas de neutralización y de inhibición de la hemaglutinación reflejan las propiedades de las glicoproteínas virales, mientras que la prueba de fijación del complemento, predominantemente refleja las propiedades de las proteínas de nucleocapside (N) (Bishop, 1985; Shope y Causey, 1962). Sin embargo, debido al reordenamiento genómico de segmentos del RNA viral, las pruebas serológicas podrían dar resultados ambiguos con respecto a la clasificación dentro de los Bunyavirus, demostrando la importancia de la caracterización molecular (Aguilar y col., 2011).

El comité internacional de taxonomía de virus (*ICTV*) reconoce 48 especies de virus agrupados dentro de este género (King y col., 2011), que a su vez mediante caracterización molecular se pueden agrupar en tres linajes principales: Linaje I, compuesto principalmente por el serogrupo norteamericano california; Linaje II, compuesto exclusivamente por virus del nuevo mundo del grupo C y el Linaje III, predominado por el serogrupo africano bunyamwera (Lambert y Lanciotti, 2008).

En sudamérica, los virus Oropouche, Guaroa y miembros del grupo C son los *Orthobunyavirus* más comunes causantes de enfermedades febriles en humanos y han causado múltiples brotes en humanos y en menor frecuencia los grupos serológicos; Guama, California y Bunyamwera (Calisher, 1998). En el Perú se han registrado brotes epidémicos causados por los virus Oropouche (Watts y col., 1997a; Watts y col., 1997b), la variante con reorganización genómica del virus Oropouche, cuyo nombre sugerido es virus Iquitos (Aguilar y col., 2011), el virus Guaroa (Aguilar y col., 2011) y virus del grupo C (Forshey y col., 2010).

2.4 Virus del grupo C

2.4.1 Generalidades

En 1961 Casals y Whitman, proponen el nombre de grupo C a un nuevo grupo serológico de arbovirus identificados en Belén, perteneciente al estado de Para en Brasil (Casals y Whitman, 1961), lugar donde se estableció en 1954, un laboratorio, por el servicio de salud pública de Brasil y la fundación Rockefeller, con el propósito de aislar y estudiar arbovirus en la región amazónica (Causey y col., 1961). Para llevar a cabo el estudio, se capturaron animales silvestres y mosquitos, se emplearon animales centinela y se tomaron muestras de sangre en humanos con enfermedad febril; lográndose aislar numeroso arbovirus, entre ellos más de 200 virus del nuevo grupo C, los cuales fueron clasificados e identificados mediante las pruebas de Inhibición de la hemaglutinación y neutralización en roedores, en 5 virus relacionados serológicamente siendo designados como: Marituba, Murutucu, Apeu, Caraparu y Oriboca. (Causey y col., 1961).

Las 5 cepas prototipo designadas, fueron aisladas, de muestras de suero extraídas de monos centinela de la especie *Cebus apella*, expuestas en distintas zonas de Belén (figura 1); por lo general las cepas prototipo, fueron los primeros aislamientos; siendo: para Oriboca la cepa An17, aislada el 30 de diciembre de 1954, de mono centinela expuesta en el bosque de Oriboca. Para Marituba la cepa An15, aislada el 27 de diciembre de 1954, de mono centinela expuesta a orillas del arroyo Marituba, bosque de Oriboca. Para Apeu la cepa An848, aislada en octubre de 1955, de mono centinela expuesta en el bosque de Oriboca, la cepa prototipo designada, fue el tercer aislamiento, los dos previos aislamientos fueron de monos centinelas expuestas en el bosque de Apeu. Para Murutucu la cepa An974, aislada en diciembre de 1955, de mono centinela expuesta en la antigua finca “Murutucu” de padres jesuitas, también, fue designada como prototipo el tercer aislamiento. Para Caraparu la cepa prototipo An3994, aislada en febrero de 1956, de mono centinela expuesta en el bosque de Utinga; sin embargo, el nombre de “Caraparu” fue propuesto en referencia al primer aislamiento de muestra humana, procedente de una colonia, ubicada en la unión del río Caraparu y Guama, el aislamiento se identificó con la cepa An3994 (Causey y col., 1961; Karabatsos, 1985).

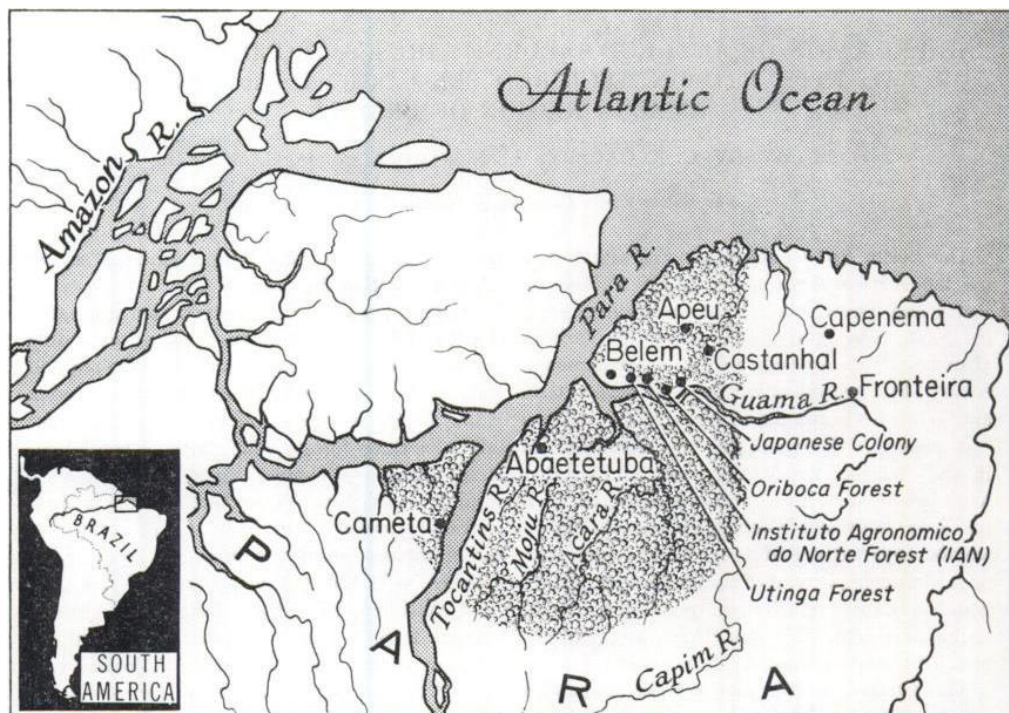


Figura 1. Localización del área de estudio de los primeros aislamientos de los virus del grupo C. Belén, estado de Para, Brasil. (Causey y col., 1961).

Seguidamente (Shope y col., 1961) reportan del mismo estudio en Belén, Brasil, un sexto prototipo de grupo C denominado Itaqui, aislado por primera vez de mono centinela Cebus, el 26 abril de 1956, cerca de una cantera de piedra.

Posterior a los estudios mencionados, muchas otras cepas de arbovirus grupo C fueron descritas en distintas regiones tropicales y sub tropicales, tales como: Nepuyo, en trinidad (Spence y col., 1966), Ossa y Madrid en Panamá (De Rodaniche y col., 1964), Restan en trinidad (Jonkers y col., 1967) entre otros.

En el Perú se documentan los primeros aislamientos de virus del grupo C en Iquitos en estudios hechos en los años 1970 y 1971 (Scherer y col., 1975), posteriormente se reportan 30 aislamientos de virus del grupo C en infecciones de humanos durante los años 2000 al 2007, actualmente sin identificación definitiva (Forshey y col., 2010).

2.4.2 Distribución geográfica.

Los virus del grupo C como los otros bunyavirus están distribuidos geográficamente en relación directa a los requerimientos de su vector específico y su hospedero. Varios reportes coinciden en que miembros del grupo C han sido encontrados en zonas tropicales y sub tropicales de países de América del sur (Brasil, Perú, Ecuador, Venezuela, Surinam y Guayana Francesa), América central (Panamá, Honduras, Guatemala y Trinidad) y América del norte (México, y el estado de Florida - Estados Unidos) (Shope y col., 1988). Siendo el país de Brasil con mayor cantidad de cepas identificadas; entre ellas: Marituba, Murutucu, Apeu, Caraparu, Oriboca, Itaqui, Bruconha y Nepuyo. En Perú se identificaron: Caraparu, Murutucu y Marituba. En Ecuador: Vines. En Venezuela: Itaqui. En Surinam: Caraparu, Restan y Oriboca. Guayana Francesa: Caraparu, Murutucu y Oriboca. En Panamá: Caraparu, Ossa, Madrid y Nepuyo. En Honduras: Restan. En Guatemala: Nepuyo. En Trinidad: Caraparu, Restan, Nepuyo y Oriboca. En México: Nepuyo. En el estado de Florida - Estados Unidos: Gumbo Limbo (Shope y col., 1988; Nunes y col., 2005).

2.4.3 Sistema de clasificación

Desde la ocurrencia de los primeros aislamientos de los virus del grupo C (década de 1950), se han clasificado serológicamente, según sus propiedades antigénicas. Inicialmente identificándose 6 tipos de virus, luego estableciendo la relación serológica entre ellos empleando las pruebas de: Inhibición de la hemaglutinación (HI), fijación del complemento (CF) y neutralización (NT) (figura 2). Cabe mencionar que las pruebas de NT y HI reaccionan con glicoproteínas de superficie y para la prueba de CF el mayor componente antigénico son proteínas de nucleocápside (Casals y Whitman, 1961; Shope y Causey, 1962; Calisher, 1998)

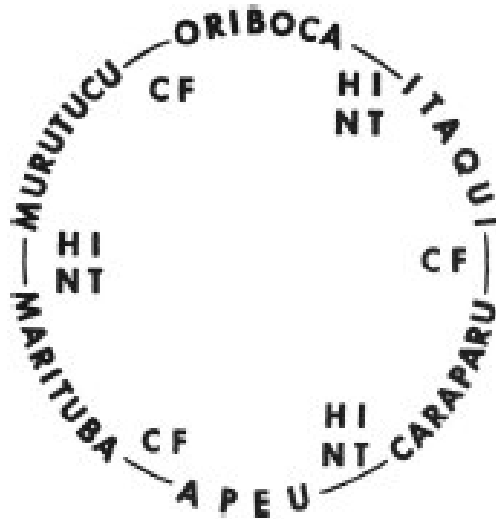


Figura 2. Relación serológica entre los distintos virus del grupo C.

HI representa la Inhibición de la hemaglutinación, CF representa la fijación del complemento y NT representa la neutralización (Shope y Causey, 1962).

Posteriormente con el aislamiento de nuevos miembros del grupo C y empleando adicionalmente pruebas de inmunofluorescencia y el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) se establecieron 4 complejos serológicos, basados en la interrelación antigénica. Estos son: **Complejo Caraparu**, que comprenden los virus Caraparu (CARV), virus Ossa (OSSAV), virus Apeu (APEUV), virus Vines (VINV) y los virus Bruconha (BRUV). El **complejo Madrid**, que comprenden el virus Madrid (MADV). El **complejo Marituba**, que comprenden los virus Marituba (MTBV), virus Murutucu (MURV), virus Restan (RESV), virus Nepuyo (NEPV) y los virus Gumbo limbo (GLV). Y el **complejo Oriboca**, que comprenden los virus Oriboca (ORIV) y los virus Itaqui (ITQV) (Nunes y col, 2005; Shope y col., 1988).

De acuerdo con la publicación del ICTV del año 2017, los virus del grupo C están ubicados taxonómicamente en el género *Orthobunyavirus*, familia: *Pheriobunyaviridae*, orden *Bunyavirales*. En esta clasificación se mencionan como especie a los virus: CARV, MADV, MTBV y ORIV, que son representantes de los 4 complejos serológicos (King y col., 2011).

2.4.4 Ciclos de transmisión y hospederos

Los arbovirus del grupo C se mantienen en la naturaleza por ciclos que involucran pequeños mamíferos forestales (roedores y marsupiales), monos y mosquitos nocturnos principalmente del género *Culex*, (figura 3). Los mosquitos se infectan rápidamente al picar los mamíferos portadores de virus. El virus se multiplica en el mosquito y transmite la infección otros hospederos susceptibles. En este ciclo, el hombre es un hospedero accidental que, al ingresar a las áreas donde hay presencia del vector y virus, se infecta por la picadura del mosquito vector infectado (Vasconcelos y col., 1998).

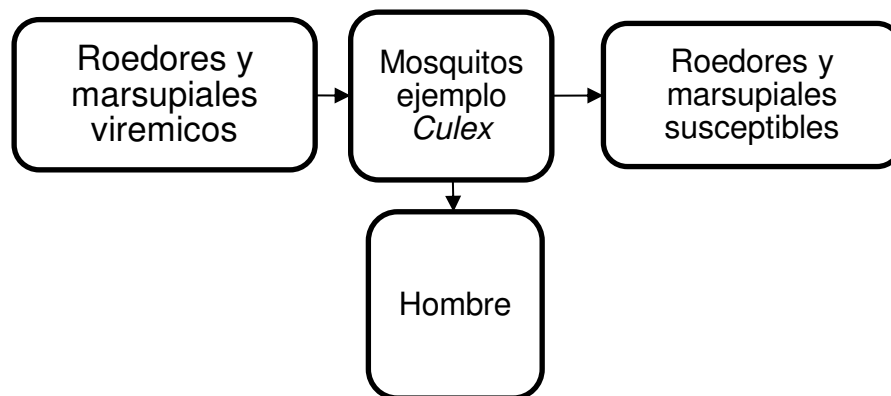


Figura 3. Ciclo de transmisión de los virus del grupo C.

Todo los arbovirus del grupo C identificados, fueron aislados de mosquitos de diferentes especies, y tienen capacidad de actuar como vectores del virus (tabla 1). En los diferentes estudios realizados, se han demostrado que los mosquitos del género *Culex*, sub género *Melanoconion*, especialmente, las especies *Culex (Mel.) portesi* y *Culex (Mel.) vomerifer*, son los más frecuentes portadores de los distintos virus del grupo C y con menor frecuencia, las especies *Culex (Mel.) spissipes*, entre otras especies del género *Culex*. Además, se debe mencionar que los virus; APEUV, GLV y ORIV fueron aislados de *Aedes* (Shope y col., 1988; Vasconcelos y col., 1998; Woodall, 1979). En el Perú se han aislado

CARV, MURV y ITQV en especies de *Culex (Mel.) gnomatos*, *Culex (Mel.) vomerifer*, *Culex (Mel.) pedroi*, *Culex (Mel.) ocosa*, *Culex (Mel.) spp* (Turrel y col., 2005) y un nuevo miembro de grupo C identificado como Huayo de *Culex portesi* (Treangen y col., 2016).

Los hospederos vertebrados difieren en función a la región o hábitat donde viven y también a los hábitos alimenticios de los vectores tal es así que, en la región forestal cerca de belén (Brasil) se capturaron y de ellos se aislaron virus de grupo C con mayor frecuencia de las especies de *Oryzomys capito* y *Proechimys guayanensis*, mientras que en Trinidad de las especies *Oryzomys laticeps* y *Zygodontomys brevicauda* (Woodall 1979). Además, se aislaron de otros mamíferos con menor frecuencia (tabla 1).

Caraparu es uno de los virus del grupo C más frecuentes en diferentes áreas y se ha recuperado en roedores y mosquitos con hábitos de alimentarse de sangre de estos animales; pero no hay reportes de aislamiento en marsupiales, haciendo pensar que los marsupiales no son susceptibles para Caraparu (Woodall, 1979). Mientras que APEUV y MTBV sí pudieron ser aislados de marsupiales (Shope y col., 1988). Por otro lado, animales centinela expuestos en áreas elevadas como rama de árboles fueron infectados con mayor frecuencia con APEUV, MTB y ORIV, mientras que animales centinelas expuestas a nivel del suelo fueron infectadas con mayor frecuencia por CARV e ITQV (Shope y col., 1988).

Tabla 1. Vectores y hospederos de los virus del grupo C

Complejo	Virus	Vectores		Hospederos		
		Género <i>Culex</i>	Otros mosquitos	Roedores	Marsupiales	Otros mamíferos
Caraparu	virus Caraparu (CARV)	<i>Cx. (Mel.) spissipes</i> <i>Cx. (Mel.) portes</i> <i>Cx. (Mel.) vomerifer</i> <i>Cx. (Mel.) spp</i> <i>Cx. (Eu.) accelerans</i> <i>Cx. (Eu.) amazonensis</i> <i>Cx. Coronator</i> <i>Cx. Nigripalpus</i> <i>Cx. Spp</i>	<i>Limatus durhamii</i> <i>Sabethini</i> <i>Wyeomyia medioalbipes</i>	<i>Oryzomys capito</i> <i>Oryzomys laticeps</i> <i>Nectomys squamipes</i> <i>Proechimys guyanensis</i> <i>Zygodontomys brevicauda</i> <i>Heteromys anomalus</i>		
	virus Ossa (OSSAV)	<i>Cx. (Mel.) taeniopus</i> <i>Cx. (Mel.) vomerifer</i>		<i>Proechimys semispinosus</i>		
	virus Apeu (APEUV)	<i>Cx. (Mel.) spp</i>	<i>Aedes arborealis</i> <i>Aedes septemstriatus</i>		<i>Caluromys philander</i> <i>Marmosa cinerea</i>	
	virus Vincas (VINV)	<i>Cx. (Mel.) vomerifer</i>				
	virus Bruconha (BRUV)	<i>Cx. (Mel.) sacchettae</i> <i>Cx. (Mel.) spp</i>				
Madrid	virus Madrid (MADV)	<i>Cx. (Mel.) vomerifer</i>		<i>Proechimys semispinosus</i>		
Marituba	virus Marituba (MTBV)	<i>Cx. (Mel.) portesi</i> <i>Cx. (Mel.) spp</i>			<i>Didelphis marsupialis</i> <i>Caluromys philander</i>	
	virus Murutucu (MURV)	<i>Cx. (Mel.) portesi</i> <i>Cx. (Mel.) vomerifer</i> <i>Cx. (Mel.) spp</i> <i>Cx. Spp</i>	<i>Coquillettidia venezuelensis</i> <i>Sabethini</i>	<i>Oryzomys capito</i> <i>Nectomys squamipes</i> <i>Proechimys guyanensis</i>	<i>Didelphis marsupialis</i> <i>Marmosa cinerea</i>	<i>Artibeus jamaicensis</i> <i>Artibeus lituratus</i> <i>Bradyptes tridactylus</i>
	virus Restan (RESV)	<i>Cx. (Mel.) portesi</i> <i>Cx. Spp</i>				
	virus Nepuyo (NEPV)	<i>Cx. (Mel.) iolambdis</i> <i>Cx. (Eu.) accelerans</i> <i>Cx. Spp</i>				
	virus Gumbo limbo (GLV)	<i>Cx. (Mel.) spp</i>	<i>Aedes taeniorhynchus</i>	<i>Sigmodon hispidus</i>		
Oriboca	virus Oriboca (ORIV)	<i>Cx. (Mel.) portesi</i> <i>Cx. (Mel.) spissipes</i> <i>Cx. (Mel.) spp</i> <i>Cx. Spp</i>	<i>Aedes taeniorhynchus</i> <i>Coq. Venezuelensis</i> <i>Coq. Arribalzagai</i> <i>Mansonia spp.</i> <i>Psorophora ferox</i> <i>Sabethini</i>	<i>Oryzomys capito</i> <i>Proechimys guyanensis</i>	<i>Marmosa cinerea</i> <i>Didelphis marsupialis</i>	
	virus Itaqui (ITQV)	<i>Cx. (Mel.) spissipes</i> <i>Cx. (Mel.) portesi</i> <i>Cx. (Mel.) vomerifer</i> <i>Cx. Spp</i>		<i>Oryzomys capito</i> <i>Nectomys squamipes</i> <i>Proechimys guyanensis</i>	<i>Marmosa murina</i> <i>Metachirus nudicaudatus</i>	

Fuente: Shope y col., 1988; Vasconcelos y col., 1998; Woodall, 1979

2.4.5 Infección en humanos

Los primeros aislamientos identificados de arbovirus del grupo C en humanos, datan de 1955, en el área forestal cerca de Belén, Brasil; donde se logran aislar e identificar los virus APEUV, ORIV, MTBV, MURV, CARV y ITQV, de personas con sintomatología febril (Causey y col., 1961; Shope y col., 1961). Luego se reportan aislamientos de OSAV y MADV en Panamá, RESV en Trinidad y NEPV en Guatemala (De rodaniche y col., 1964; Jonkers y col., 1967; Spence y col. 1966). Posterior a los primeros aislamientos se logran identificar distintos virus del grupo C en varias zonas de América, así también se demostraron la preexistencia de este virus en diversos estudios serológicos (Shope y col. 1988). Aunque ninguno de los casos reportados ha sido asociado a brotes epidémicos son una amenaza para la salud pública.

Las personas infectadas con virus del grupo C, por lo general, desarrollan fiebre, con inicio repentino entre 38 – 40 °C, dolor de cabeza severo, vértigo, dolor de espalda, dolores musculares, dolores en articulaciones y algunos casos, náuseas y fotofobia. También pueden reportarse casos con leucopenia. Los síntomas se mantienen entre 4 y 5 días y los pacientes pueden recuperarse con debilidad y anorexia que puede durar entre 1 a 2 semanas, pero sin ninguna secuela (Shope y col., 1988).

2.4.6 Diagnóstico

Debido a las manifestaciones clínicas muy parecidas entre sí, el diagnóstico de infecciones humanas con grupo C, pueden ser manejados de la misma forma que otras arbovirosis. Por ello es muy importante el diagnóstico de laboratorio, que identifica el agente o evidencia la presencia del mismo. La identificación del virus, puede hacerse a partir de muestras de sangre o tejidos, empleando técnicas moleculares o mediante el aislamiento del virus por inoculación intra-cerebral de ratones recién nacidos, o en cultivo celular, de preferencia la línea celular Vero (derivada de riñón de mono africano *Chlorocebus sp.*; antiguamente llamado *Cercopithecus aethiops*). Después de la inoculación en ratones recién

nacidos, estos mueren entre 1- 3 días y los cultivos celulares inoculados pueden dar efecto citopático entre las 24 a 72 horas.

Para evidenciar la presencia del virus, se pueden emplear técnicas de diagnóstico serológico, como las pruebas de inhibición de la hemaglutinación, fijación del complemento, neutralización y ELISA. Estas pruebas detectan anticuerpos preexistentes en muestras séricas y son empleadas para estudios de seroprevalencia y determinación de infecciones recientes con seroconversión de anticuerpos específicos, para esto es necesario obtener muestras séricas pareadas con al menos 2 semanas de diferencia.

Debido a la carencia de un tratamiento específico contra el virus, el paciente infectado debe ser tratado con antipiréticos y reposo por unos días.

2.4.7 Características físicas del virus

La estructura de los virus del grupo C representada en la figura 4, es muy similar al resto de los Orthobunyavirus, en general los viriones, son pleomórficos, de 100 – 116 nm de diámetro en promedio, rodeada por proyecciones conformadas por 2 tipos de glicoproteínas, denominadas Gn y Gc, los cuales están incrustados en la bicapa lipídica de la envoltura, de aproximadamente 5 nm de espesor y sobresalen en 18 nm de la membrana. La envoltura del virión usualmente deriva de la membrana del aparato de Golgi o en algunas ocasiones de la membrana celular y contiene los determinantes antigénicos hemaglutinantes y neutralizantes. La nucleocápside viral es de 2 – 2.5 nm de diámetro y de 200 – 300 nm de longitud y contiene a 3 moléculas de RNA cadena simple (ssRNA) sentido negativo, designadas L (*large*), M (*medium*) y S (*small*). Los determinantes antigénicos fijadores del complemento están asociados principalmente a proteínas de la nucleocápside. Por sus características los viriones son sensibles al calor, solventes lipídicos, detergentes y formaldehído (Bishop y Beaty, 1988; Elliot, 1990; Elliot, 2014; King y col., 2011).

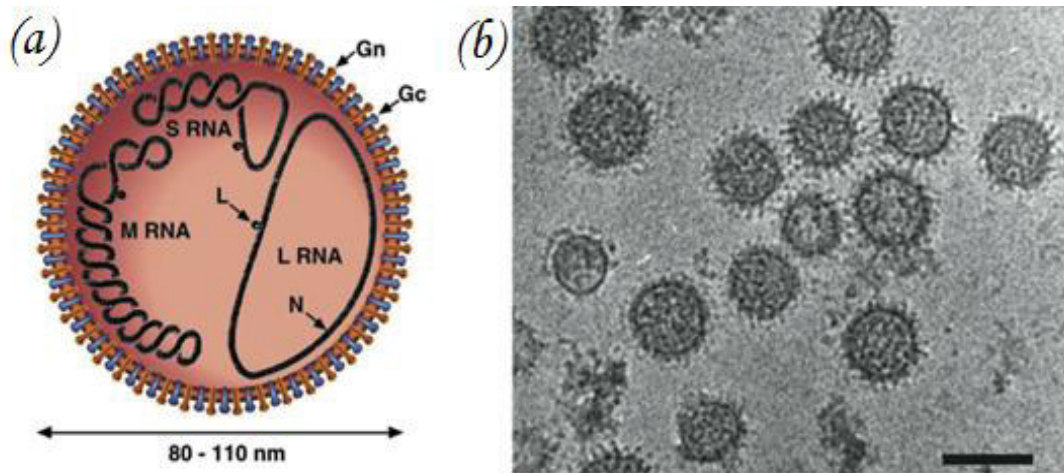


Figura 4. Orthobunyavirus.

(a) Diagrama representativo de un Orthobunyavirus. La superficie muestra 2 proyecciones de glicoproteínas denominadas Gn y Gc. La nucleocápside proteica (N) envuelve los 3 segmentos de RNA circulares (L, M y S).

(b) Microscopía electrónica de partículas virales (King y col., 2011).

2.4.8 Características genéticas

La organización genética, tamaño y estrategias de expresión son similares en todos los miembros del género *Orthobunyavirus*; cada segmento genómico posee regiones no traducibles (NTRs) localizadas en las terminaciones 3' y 5', que flanquean una sola unidad de transcripción (figura 5), estas NTRs son altamente conservadas, las secuencias en estos extremos están involucradas en la síntesis de RNA y empaquetamiento del segmento (Walter y Barr, 2011).

Para el caso particular del género *Orthobunyavirus*, se ha determinado, para los segmentos genómicos L, M y S, secuencias nucleotídicas terminales consenso en 3'; UCAUCACAUGA... y 5'; AGUAGUGUGCU... (King y col., 2011).

Las proteínas N y NSs son codificadas en la superposición de los marcos de lectura por el RNA S y son traducidos a partir del mismo RNAm complementario como resultado de alternación del uso del codón de iniciación AUG. Las glicoproteínas Gn, Gc y una proteína NSm de 15-18 KDa son codificados como una poliproteína precursora por el RNA M. Reordenamientos genómicos han

sido demostrados entre virus que pertenecen a la misma especie, pero no entre virus de diferentes especies (King y col., 2011).

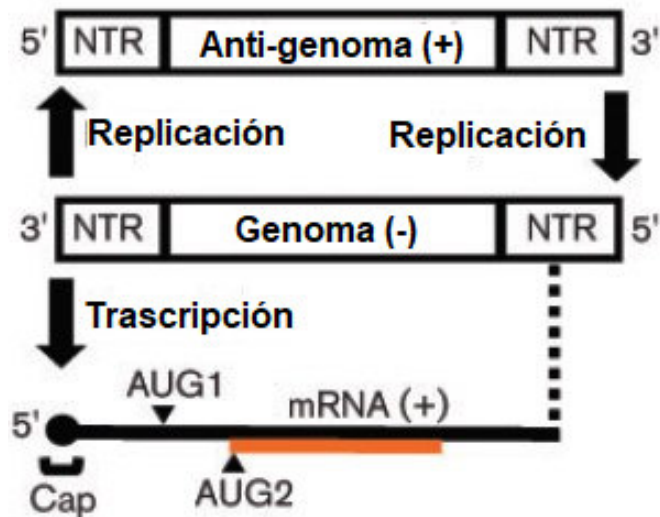


Figura 5. Ubicación de los NTRs y la estrategia de expresión (Walter y Barr, 2011).

El genoma viral en general, comprende de tres segmentos únicos de RNA cadena simple y sentido negativo, es decir, necesita ser transcrito en sentido positivo para la producción de proteínas. Cada segmento es responsable de la codificación de proteínas necesarias para el ensamblaje de nuevas partículas virales (figura 6). Las características de estos segmentos genómicos son:

Segmento RNA L (*Large*). Posee en promedio 6867 nucleótidos (Hang y col., 2014) y codifica el componente viral RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp), que es una sola proteína larga (L) producto de este segmento, de 2248 aminoácidos (260 kDa), esta molécula “larga” desarrolla varias funciones complejas, que en conjunto resultan en la generación de réplicas de RNA y la transcripción de productos de RNAm de sus respectivas plantillas (Elliott, 1990; Elliot, 2014; King y col., 2011; Walter y Barr, 2011).

Segmento M (*Medium*). Posee en promedio 4436 nucleótidos y codifica una poliproteína precursora de 1430 Aa (Hang y col., 2014), el cual es insertado en la membrana del retículo endoplasmático, donde es dividido en 2 glicoproteínas estructurales, Gn (32-35 KDa) y Gc (110-120 KDa) por proteasas de la célula hospedera, estos polipéptidos divididos forman un heterodímero ligado a disulfuro, los cuales son transportados y retenidos en el aparato de Golgi. El heterodímero Gn-Gc juega un rol crítico en la mediación del ensamblaje viral, formación de partículas virales, unión con los receptores de las células del hospedero y juegan un papel muy importante en los procesos de neutralización mediada por anticuerpos. Además de esta misma poliproteína precursora es dividida por proteasas celulares, una proteína no estructural (NSm) de 16-18 KDa, que ha sido encontrado dentro de estructuras tubulares específicas, asociadas al aparato de Golgi y juega un papel importante en el ensamblaje del virus (Elliott, 1990; Elliott, 2014; Obijeski y col., 1977; Walter y Barr, 2011). Shi y col. (2016) definen los sitios de escisión y los límites donde las proteínas son divididas entre los residuos 17–312, para Gn; 332–477 para NSm; y 478–1433 para Gc.

Segmento S (*Small*). Posee en promedio 1041 nucleótidos y codifica 2 proteínas. Una proteína de nucleocapside (N) de aproximadamente 235 Aa (26 KDa), cuyo principal rol es encapsidar los segmentos de RNA productos de la replicación, para formar el complejo ribonucleoproteína. Y una proteína no estructural denominada NSs de aproximadamente 83 Aa (10 KDa), cuyo rol principal es el de modular la respuesta antiviral de la célula hospedera. Las proteínas N y NSs son traducidos por el mismo RNAm codificado, con un marco de lectura sobrepuesto (Elliott, 1990; Elliott, 2014; Hang y col., 2014; Obijeski y col., 1977; Walter y Barr, 2011).

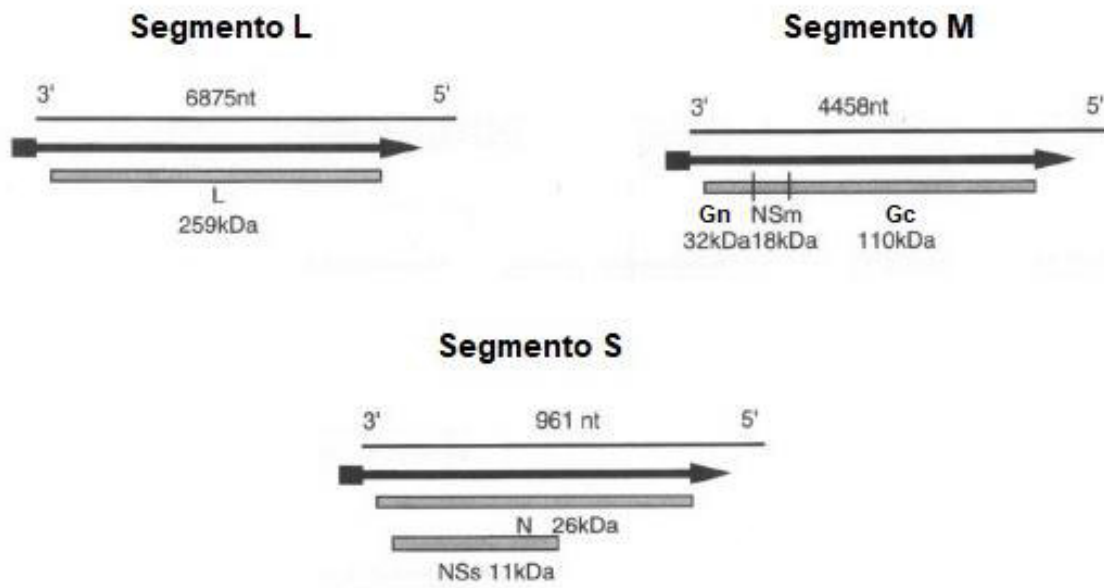


Figura 6. Estrategias de codificación de los segmentos genómicos (Elliott, 1997).

3. HIPÓTESIS

Los virus aislados e identificados como grupo C de las áreas tropicales del Perú (género *Orthobunyavirus*) conforman grupos filogenéticos y serológicos distintos entre sí y con las cepas referenciales.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Caracterizar genéticamente los virus del grupo C (género *Orthobunyavirus*), aislados de pacientes con síndrome febril provenientes de áreas tropicales del Perú.

4.2 Objetivos específicos

1. Evaluar las secuencias nucleotídicas conocidas de los virus grupo C referenciales.
2. Diseñar *primers* para las regiones S, M y L capaces de reconocer los distintos virus del grupo C.
3. Determinar las relaciones filogenéticas de los virus grupo C aislados en el Perú y los virus referenciales.
4. Evaluar las características antigénicas de los virus aislados mediante la prueba de neutralización.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Muestra

Los aislamientos virales usados en el presente estudio provienen de localidades cercanas a las ciudades de Iquitos (provincia de Maynas), Yurimaguas (provincia de Alto Amazonas) y Puerto Maldonado (provincia de Tambopata). Maynas está localizada en el departamento de Loreto, zona nor-oriental del Perú, cuya capital es la ciudad de Iquitos, que se ubica a la margen izquierda del río Amazonas, es el centro urbano más importante de la amazonía peruana y es la sexta ciudad más poblada del país, tiene una población de 545705 habitantes (estimación al año 2013). Alto Amazonas está localizada al sur-este de la ciudad de Iquitos, tiene una población estimada de 118238 habitantes. Tambopata está localizada en el departamento de Madre de Dios, sur-este del Perú y cuenta con una población estimada de 94463 habitantes (INEI 2009).

5.2 Población involucrada en el estudio

Las muestras empleadas en el presente estudio provienen de sujetos enrolados entre los años 1995 y 2013, como parte del estudio de vigilancia de enfermedades febriles, cuyos protocolos: DoD 30517, NMRC.D.2000.0006, fueron aprobados por el comité ético institucional del *U.S. Naval Medical Research Center* (NMRC, Silver Spring, MD) y el protocolo NMRC.D.2010.0010, aprobado por el comité ético institucional del *U.S. Naval Medical Research Unit No. 6*, Perú (NAMRU-6; Lima, Perú) a su vez revisados y aprobados por el Ministerio de Salud del Perú. El estudio de vigilancia se realizó con el apoyo de los centros de salud de las ciudades de Iquitos, Puerto Maldonado, Yurimaguas, Piura, Tumbes, Cusco, Ucayali, Lima y La Merced. Los criterios de inclusión incluyen sujetos mayores de 5 años que presentaban enfermedad febril aguda indiferenciada (fiebre ≥ 38 °C) no mayor de 7 días de duración y síntomas como dolor de cabeza y otros síntomas no específicos. De cada sujeto voluntario se obtuvo muestras de sangre, una en la fase febril de la enfermedad (muestra aguda) y otra después de 2 a 4 semanas de ocurrido los síntomas (muestra convaleciente). Cada voluntario involucrado en el

estudio, firmó un consentimiento informado y proveyó información clínica y demográfica. En los casos donde los voluntarios fueron menores de 18 años el consentimiento fue firmado por el padre o tutor.

5.3 Aislamiento viral

Las muestras de suero obtenidas en la fase aguda de la enfermedad, fueron inoculadas en cultivos celulares utilizando líneas provenientes de riñón de mono verde africano (Vero) y células provenientes de glándula salival de mosquito *Aedes albopictus* (C6/36). Para el proceso de inoculación, cada muestra de suero se diluyó 1/5 en medio de mantenimiento E-MEM (medio mínimo esencial con sales de Eagle) suplementado con 2 % de suero bovino fetal; se inoculó 200 µL del suero diluido sobre una monocapa de células contenidas en frascos de cultivo de 12 cm² de área de crecimiento, luego se incubó por una hora, las líneas celulares Vero, a 37 °C y las líneas celulares C6/36, a 28 °C (para permitir adsorción y penetración viral), al cabo de este tiempo se añadió 4 mL de medio de mantenimiento en los frascos inoculados y se volvió a incubar a las temperaturas respectivas; en los días posteriores a la inoculación los cultivos fueron examinados diariamente durante 10 días para evidenciar efecto citopático (CPE). Los cultivos fueron colectados cuando se observó CPE de 70 – 100 % o en su defecto al cabo de los 10 días de incubación. Se tomó 1 mL de cada cultivo y centrifugó a 2000 RPM por 15 minutos, el sedimento fue resuspendido con *buffer* fosfato salino (PBS) e impregnados en láminas portaobjeto de vidrio de 24 pozos (aprox. 10 µL por pozo), se dejó secar dentro de una cabina de bioseguridad y se fijó con acetona a -20 °C (aprox. por 20 minutos), cumplido este periodo, se volvió a secar y se desarrolló la prueba de inmunofluorescencia usando anticuerpos de ratón específicos contra los arbovirus frecuentes en el Perú y anticuerpos conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FICT) específicos contra anticuerpos de ratón.

Todos los aislamientos identificados a este grupo viral (grupo C) (tabla 4) y 6 cepas referenciales (tabla 2), fueron re-cultivados sobre monocapa de células Vero para incrementar su volumen y concentración, el procedimiento fue similar al aislamiento viral, con la única diferencia de que se usaron frascos de cultivo con

área de crecimiento de 75 cm²; obteniendo al final 20 mL de volumen de suspensión viral, el cual fue repartido en alícuotas de 1 mL en viales criogénicos y congelados a -80 °C hasta su uso.

Tabla 2. Cepas referenciales de *Orthobunyavirus* del grupo C (GRCV) usados en el estudio.

Año	Cepa	Lugar del aislamiento	Fuente, hospedero	Número de ascensión GenBank (Segmentos S, M y L)
1956	Caraparu (CARV) BeAn3994	Belem, Brazil	Suero, <i>Cebus apella</i>	MH052061, MH052128, MH052195
1954	Oriboca (ORIV) BeAn17	Belem, Brazil	Suero, <i>Cebus apella</i>	MH052062, MH052129, MH052196
1955	Murutucu (MURV) BeAn974	Belem, Brazil	Suero, <i>Cebus apella</i>	MH052063, MH052130, MH052197
1955	Apeu (APEUV) BeAn848	Belem, Brazil	Suero, <i>Cebus apella</i>	MH052064, MH052131, MH052198
1954	Marituba (MTBV) BeAn15	Belem, Brazil	Suero, <i>Cebus apella</i>	MH052065, MH052132, MH052199
1996	Itaqui (ITQV) PE00036	Loreto, Peru	Pool de Mosquito	MH052066, MH052133, MH052200

Las cepas referenciales de GRCV listados, fueron obtenidos gracias a la cortesía del Dr. Robert Tesh y el centro de referencia mundial para virus emergentes y arbovirus del centro médico de la universidad de Texas o UTMB, por sus siglas del inglés “University of Texas Medical Branch”, Galveston, TX

5.4 Caracterización genómica

Ocho aislamientos fueron enviados al *Walter Reed Army Institute of Research* (WRAIR) para obtener la secuencia completa del genoma viral usando amplificación ramdomizada y pirosecuenciación (Hang y col., 2012; Hang y col., 2014).

5.4.1 Diseño de *primers*

Usando las secuencias genómicas de los aislamientos enviados a WRAIR y otras secuencias de los virus del grupo C publicadas (Nunes y col., 2005) y depositadas en el banco de genes (GenBank), se diseñaron *primers* para los 3 segmentos genómicos (S, M y L), para ello se usaron herramientas de

bioinformática como MEGA7, Fast PCR, Primer express 3.0, PriFi, Primer3 y Oligoanalyzer 3.1

5.4.2 Extracción de RNA Viral

El RNA viral de todos los virus involucrados en el estudio, fueron extraído usando el kit QIAamp viral RNA (Qiagen, Valencia, CA) siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante y detallado a continuación.

En un tubo de 1.5 mL se agregó 560 μ L de *buffer* AVL conteniendo 5.6 μ g de RNA *carrier* (*buffer* preparado previamente; 310 μ g de RNA *carrier* liofilizado, reconstituido en 310 μ L de *buffer* AVE y diluido en 31 mL de *buffer* AVL), luego se adicionó 140 μ L de muestra (cultivo de virus). Se mezcló vigorosamente e incubó por 10 minutos (min) a temperatura ambiente (15 – 25 °C), luego de este tiempo se hizo un centrifugado rápido para recuperar gotas atrapadas en la tapa, seguidamente se agregó 560 μ L de etanol (96 – 100 %), se mezcló vigorosamente y se volvió a hacer un centrifugado rápido. Luego se transfirió 630 μ L de la mezcla en las columnas *QIAamp Mini spin* ensambladas sobre tubos de colección de 2 mL, se tapó y centrifugó a 6000 x g por 1 min, se descartó el tubo de colección con el centrifugado, luego se agregó el restante de la mezcla (aprox. 630 μ L) en las mismas columnas ensambladas con nuevos tubos de colección y centrifugó a 6000 x g por 1 min. Luego se destapó cuidadosamente y se agregó en las columnas, 500 μ L de *buffer* AW1, se tapó y centrifugó a 6000 x g por 1 min, a continuación, se volvió a ensamblar las columnas con nuevos tubos de colección y se agregó 500 μ L de *buffer* AW2, se centrifugó a 20000 x g por 3 min. Después del proceso, las columnas fueron transferidas a tubos de microcentrífuga de 1.5 mL, se agregó 60 μ L de *buffer* AVE e incubó por 1 min, finalmente se centrifugó a 6000 x g por 1 min. El producto obtenido (RNA viral extraído) se guardó a -70 °C hasta su uso.

5.4.3 Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

El proceso de RT-PCR se estandarizó para llevarse a cabo en un solo paso. Para obtener amplificaciones exitosas se probaron los diferentes *primers* diseñados en el laboratorio.

La prueba estandarizada, se desarrolló para emplear los mismos componentes; en la retro-transcripción del RNA y la amplificación del DNA complementario (cDNA), para los 3 segmentos genómicos del virus (S, M y L). Y se llevó a cabo empleando la mezcla: 1 μM de *primer forward*, 1 μM de *primer reverse*, 200 μM de desoxi-nucleótidos trifosfatados (dNTPs), (Promega, Madison, WI); 5 μM dithiothreitol (DTT); 5 unidades de transcriptasa reversa de virus mieloblastosis aviar (AMV RT, Promega, Madison, WI), 2.5 unidades de polimerasa GoTaq DNA (Promega, Madison, WI), 1X *buffer* de reacción *green GoTaq* (Promega, Madison, WI, USA) y 10 μL de RNA viral extraído. Toda la mezcla hace un volumen final de 50 μL .

Las condiciones de termociclado estandarizadas, fueron diferentes para los segmentos genómicos S, M y L del virus. Para el RNA del segmento S, la retrotranscripción se efectuó a 42 °C por 60 min y 95 °C por 2 min, seguidos por 35 ciclos de PCR, de 94 °C por 40 segundos (desnaturalización), 50 °C por 40 segundos (alineamiento) y 72 °C por 50 segundos (extensión), finalmente a 72 °C por 5 min (elongación final) y el producto se conservó a 4 °C para la electroforesis y la secuenciación. Para el RNA de los segmentos M y L, la retrotranscripción se efectuó a 42 °C por 60 min y 95 °C por 2 min, seguidos por 40 ciclos de PCR de 94 °C por 40 segundos (desnaturalización), 45 °C por 40 segundos (alineamiento) y 72 °C por 60 segundos (extensión), finalmente a 72 °C por 10 min (elongación final) y el producto se conservó a 4 °C para la electroforesis y la secuenciación.

5.4.4 Electroforesis

Para la visualización de los productos amplificados por RT-PCR (DNA amplificado) se efectuó la electroforesis en geles de agarosa (la agarosa de estado

sólido se disuelve en *buffer* a temperaturas superiores a 60 °C). Para ello se prepararon geles de agarosa en *buffer* TBE, al 2 % para productos amplificados del segmento S y al 1.5 % para productos amplificados de los segmentos M y L. Se dejó solidificar sobre un molde rectangular, con un peine en uno de los extremos (el peine forma los pocillos donde se colocan las muestras). Una vez solidificada el gel y retirado el peine, se agregó en cada pocillo, 8 µL de los productos amplificados (para cada muestra). Después de añadir las muestras y un marcador de peso molecular en los geles de agarosa, se colocaron en las cámaras electroforéticas conteniendo suficiente *buffer* TBE para cubrirlos. Luego se aplicó 500 Amperios (A) de corriente eléctrica a 110 voltios (V) por 70 min.

La visualización de bandas formadas en los geles, se efectuaron sumergiendo las corridas electroforéticas por 20 min, en *buffer* TBE conteniendo 0.5 mg/mL de bromuro de etidio y empleando un transiluminador con luz ultravioleta con longitud de absorción de 254 nm, y longitud de emisión de 366 nm. La señal fluorescente formada es proporcional a la cantidad de producto.

Para los segmentos genómicos M y L se volvieron a realizar la electroforesis en geles de agarosa empleando 10 µL por producto amplificado. Procedimiento requerido para cortar las bandas correspondientes y purificarlas para su secuenciación.

5.4.5 Purificación del DNA amplificado

Los productos amplificados del segmento genómico S, fueron purificados directamente empleando columnas de *centri-sep* (Princeton separations, Inc.), debido a que el gel mostró banda única. Para ello, columnas de *centri-sep* fueron reconstituidas con 800 µL de agua ultra pura, se agitó y dejó hidratar por más de 30 min a temperatura ambiente, luego se retiró la tapa superior de las columnas y la tapa de la base, se dejó drenar el exceso de agua en tubos de 2 mL y se descartó el fluido. Para retirar el fluido no drenado sobrante de las columnas, se volvieron a colocar en tubos de 2 mL, se centrifugaron a 750 x g por 2 min, luego se adicionó 20 µL de los productos de ADN amplificado, directamente

al centro superior del gel, se colocaron tubos de colección de 1.5 mL y se dispusieron las columnas en la centrifuga, manteniendo la misma orientación del centrifugado anterior. Se centrifugó a 750 x g por 2 min y el producto purificado se recuperó en el tubo de colección.

Los productos amplificados de los segmentos M y L fueron recuperados de geles de agarosa y purificados usando el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Madison, WI, USA), debido a que el gel mostró múltiples bandas. Para ello, empleando un estilete estéril, se cortaron los fragmentos deseados de DNA ubicados en el gel de agarosa (formada después de la corrida electroforética). Los cortes se colocaron en tubos de 1.5 mL y sobre esta, se agregó la solución de unión a la membrana (*membrane binding solution*), en proporción de 10 µL por cada 10 mg de gel conteniendo el DNA. Se incubó entre 50 - 65 °C con agitación esporádica, hasta la completa disolución del gel. Los *SV minicolumn* del kit, se ensamblaron con tubos de colección y agregaron los geles disueltos; se incubó por 1 min a temperatura ambiente, luego se centrifugó a 16000 x g por 1 min. Se descartó el líquido contenido en los tubos de colección y se lavaron los *SV minicolumn* nuevamente ensamblados, agregando 700 µL de solución de lavado de membrana, previamente mezclada con 95% de etanol (la mezcla fue hecha de acuerdo a las especificaciones descritas en el kit), se centrifugó a 16000 x g por 1 min, se descartó el líquido contenido en los tubos de colección y se volvió a ensamblar los *SV minicolumn* con tubos de colección. Se repitió el lavado con 500 µL de solución de lavado de membrana, se centrifugó a 16000 x g por 5 min, luego se descartó el líquido contenido en los tubos de colección y se volvió a centrifugar a 16000 x g por 1 min para evaporar cualquier residuo de etanol. Después del proceso de lavado, los *SV minicolumn* se colocaron en tubos nuevos de 1.5 mL y se agregaron en la parte central de las columnas, 50 µL de agua libre de nucleasas, se incubó por 1 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 16000 x g por 1 min y se recuperó el producto purificado contenido en los tubos de 1.5 mL.

Los productos de DNA purificados, fueron guardados a -70°C hasta su uso.

5.4.6 Secuenciación

Los productos purificados fueron secuenciados usando el kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems)* y se emplearon los mismos *primers* usados en el RT-PCR.

La secuenciación se desarrolló en una placa óptica de 96 pozos (*microamp optical 96-well reaction plate*) y se añadió en cada pozo: 4 µL de *BigDye terminator v3.1 cycle sequencing*, 4 µL de *BigDye terminator v1.1, v3.1 5X sequencing buffer*, 1 µL de *primer* 10 µM, 10 µL de producto de DNA purificado y 1 µL de agua. Se taparon los pozos de las placas, se mezclaron bien y se centrifugó a 1000 x g por 10 segundos para que la mezcla este en la base de los pozos. La placa se colocó en un termociclador con las siguientes condiciones: 96 °C por 1 min, seguido por 25 ciclos de 96 °C por 10 segundos (desnaturalización) y 50 °C por 5 segundos (alineamiento), 60 °C por 4 min (extensión). El procedimiento se efectuó empleando los *primers forward* y *reverse* de manera independiente para cada muestra. Finalmente, el producto se guardó a 4°C.

Los productos obtenidos fueron purificados, usando columnas de *centri-sep* (Princeton separations, Inc.), o empleando el método de precipitación por etanol.

El procedimiento usando columnas de *centri-sep* fue descrito en “5.4.5 Purificación del DNA amplificado”. Los productos purificados por este método fueron deshidratados usando una centrifuga al vacío, luego reconstituidas con 12 µL de formamida y trasferidos en placas de secuenciación de 96 pozos (*microamp optical 96-well reaction plate*).

El procedimiento usando el método de precipitación por etanol, se efectuó agregando directamente sobre los productos de cada reacción, 80 µL de *buffer* de limpieza para secuenciamiento (ver anexo), se cubrieron las placas, se agitaron vigorosamente y se incubó por 30 min a temperatura ambiente, luego se centrifugó a 2000 x g por 30 min. Se retiró el sobrenadante invirtiendo la placa sobre papel toalla y centrifugando a 50 x g por 10 segundos, seguidamente se agregó 100 µL de etanol al 70%, se centrifugó a 2000 x g por 15 min. Nuevamente se retiró

el sobrenadante invirtiendo la placa sobre papel toalla y centrifugando por a 50 x g por 10 segundos, se dejó evaporar el residuo de etanol a temperatura ambiente por 10 min en oscuridad. Luego se agregó con 12 µL de formamida para reconstituir el precipitado deshidratado.

Ambos métodos demostraron tener productos purificados de buena calidad.

Los productos purificados y reconstituidos con formamida por cualquiera de los métodos fueron desnaturalizados en un termociclador a 94 °C por 2 min y enfriados rápidamente a 4 °C, la placa se centrifugó a 500 x g por 30 segundos y se colocaron en el analizador genético ABI 3130 XL (Applied biosystems) con capilares de 80 cm, para determinar las secuencias nucleotídicas.

5.4.7 Análisis de las secuencias y filogenia

Las secuencias nucleotídicas parciales obtenidas para los segmentos genómicos S, M y L de los distintos aislamiento y virus referenciales de grupo C, fueron ensambladas y analizadas usando el programa informático Sequencher 4.8. En adición a las secuencias generadas en el presente estudio (65 aislamientos y 6 virus referenciales) fueron incluidas para el análisis genético, secuencias de los virus Madrid cepa BT4075 (con números de ascensión en el GenBank KF254781, KF254780 and KF254779) (Hang y col., 2014) e IQT9646 (con números de ascensión en el GenBank KM092514, KM092513, KM092512) (Hontz y col., 2015).

El alineamiento múltiple de secuencias por ClustalW, comparación por pares de bases, análisis de secuencias múltiples y construcción de árboles filogenéticos fueron desarrollados empleando los programas bioinformáticos BioEdit 7.2 (Hall, 1999) y MEGA7 (Kumar y col., 2016).

Los arboles filogenéticos fueron construidos usando el método de Neighbor-Joining y las distancias fueron calculadas usando el modelo de Kimura 2-parametros con análisis *bootstrap* de 1000 repeticiones.

5.5 Análisis antigénico

Para efectuar el análisis antigénico de los aislamientos de grupo C, fue necesario producir anticuerpos policlonales contra los virus referenciales de grupo C y estandarizar las pruebas de neutralización y ELISA.

5.5.1 Preparación de antisueros

Antisuero de ratón o llamado también, fluido ascítico hiperinmune de ratón (HMAF), fué desarrollado contra; APEUV BeAn848, MURV BeAn974, CARV BeAn3994, ITQV (PE-00036, aislado de pool de mosquito en Perú (Turell y col., 2005)), ORIV BeAn17 y MTBV BeAn15, siguiendo los procedimientos descritos por Tikasingh y col., (1966) y Sartorelli y col., (1966); donde se emplearon ratones hembra de raza Balb/c de 6 a 7 semanas de nacido y como inóculos inmunogénicos, virus inactivados preparados en cerebro de ratón lactante. Se siguió el siguiente esquema de inmunización: el día cero, se inoculó 0.2 mL de virus inactivado, vía intra-peritoneal (IP) y 0.3 mL de adyuvante de Freud completo, vía subcutánea (SC); el día 4 se inoculó virus inactivados, 0.2 mL IP y 0.3 mL SC; el día 21 se inoculó emulsión de virus inactivado y adyuvante, 0.2 mL IP y 0.3 mL SC; el día 28 se inoculó virus inactivado, 0.2 mL IP y 0.3 mL SC; el día 35 se inoculó suspensión de sarcoma 180, 0.4 mL IP; este último, para inducir formación de fluido ascítico rico en anticuerpos; el cual se colectó después de una semana. El HMAF obtenido, se clarificó por centrifugación a 7000 x g por 30 min y repartió en viales criogénicos para su conservación a -70 °C.

Los ensayos con animales fueron realizados en cumplimiento con la ley del bienestar de los animales en investigación y en concordancia con los principios establecidos en la "Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio" *Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council, National Academy Press, 2011.*

5.5.2 Prueba de microneutralización (MNT) en cultivo celular

Para evaluar la relación antigénica entre los virus del grupo C, aislamientos y referenciales, se llevaron a cabo ensayos de MNT empleando el método modificado del descrito por Russell y col. (1967). En el procedimiento, todos los aislamientos y virus referenciales del grupo C, fueron titulados haciendo diluciones seriadas logarítmicas en placas de cultivo celular de 96 pozos, fondo plano, para ello se empleó medio de mantenimiento para cultivo celular (ver anexo); la titulación se desarrolló con 7 repeticiones para cada dilución y volumen final de 100 μL por pozo. Seguidamente, sobre cada pozo, se agregó 100 μL de cultivo celular Vero en suspensión, a una concentración de 5×10^5 células/ mL y se incubó por 3 días a 37 °C en una incubadora con 5% de atmosfera de CO_2 . Al cabo de este tiempo, el líquido sobrenadante de las placas fue descartado sobre solución desinfectante, luego las placas fueron fijadas y coloreadas empleando colorante para neutralización (ver anexo). El título obtenido para cada virus, fue la dilución más alta donde se observó CPE igual o mayor al 50% en los pozos, conocida como dosis infectiva del 50% en cultivo de tejidos (TCID₅₀). La dilución de trabajo de la suspensión viral empleada para la neutralización se determinó entre 30 a 300 TCID₅₀.

Una vez determinada la dilución de trabajo de los virus; los 6 antisueros preparados (HMAF-APEUV, HMAF-CARV, HMAF-ITQV, HMAF-MTBV, HMAF-MURV y HMAF-ORIV) fueron inactivados a 56 °C por 30 minutos, luego se realizaron diluciones seriadas al doble (desde 1/20 hasta 1/2560) empleando medio de mantenimiento para cultivo celular (ver anexo). Cada dilución de cada HMAF fue mezclado y enfrentado contra la dilución de trabajo obtenida previamente para cada virus del grupo C (aislamientos y referenciales). La mezcla fue realizada empleando placas de cultivo celular de 96 pozos; cada pozo con 50 μL de dilución de HMAF y 50 μL de dilución de trabajo de cada virus. Seguidamente se incubó a 37 °C por 1 hora, luego se adicionó, 100 μL de cultivo celular Vero en suspensión, a una concentración de 5×10^5 células/ mL. Se incubó por 3 días a 37 °C en una incubadora con 5% de atmosfera de CO_2 . Luego de este tiempo, el líquido sobrenadante de las placas fue descartado sobre solución desinfectante, finalmente las placas fueron fijadas y coloreadas empleando colorante para

neutralización (ver anexo). El título de neutralización de los anticuerpos fue la dilución más alta donde las células fueron protegidas de infección viral, es decir, visualmente la última dilución con menos del 50% de CPE en la monocapa celular.

5.5.3 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Antígenos virales de virus referenciales, fueron preparados en cultivo celular e inactivado con BEI 3mM. Empleando placas de 96 se impregnaron con anticuerpos anti IgM humano a 4 °C diluidas con PBS por toda una noche. Al día siguiente se agregaron las muestras de suero convalecientes (suero de personas en fase de recuperación, 15 -20 días post-infección) diluidas 1/100 en *buffer* para ELISA (ver anexo) y se dejó incubando a 37 °C por 1 hora, luego las placas se lavaron con *buffer* de lavado para ELISA (ver anexo). Seguidamente se adicionaron los distintos antígenos virales preparados, se incubó a 37 °C por 1 hora y se volvieron a lavar con *buffer* de lavado para ELISA. Luego se agregó un pool de antisueros anti virus del grupo C producidos en ratón y diluidos en *buffer* para ELISA, se incubó a 37 °C por 1 hora, se volvió a lavar y se agregó conjugado peroxidasa - anti anticuerpo de ratón diluido en *buffer* para ELISA; se incubó a 37 °C por 1 hora, se volvió a lavar y se agregó sustrato ABTS para visualizar color por reacción positiva. Se incubaron a 37 °C por 30 min. Finalmente, las placas fueron leídas en un lector de ELISA a una longitud de onda de 405 nm con filtro de referencia de 630 nm, para determinar la densidad óptica de cada reacción.

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1 Población involucrada en el estudio

En total, 65 aislamientos de GRCV fueron identificados por la prueba de inmunofluorescencia indirecta entre los años 1995 y 2013 a partir de muestras de suero obtenidas de 38277 pacientes febriles (en fase aguda de la enfermedad). Los GRCVs fueron aislados en cultivo celular de muestras de pacientes colectados en Iquitos (noreste de Perú; 45 aislamientos de 25293 muestras de fase aguda), Yurimaguas (noreste de Perú; 7 aislamientos de 2241 muestras) y Puerto Maldonado (sureste de Perú; 13 aislamientos de 3524 muestras). En contraste, no se lograron aislar GRCVs en Tumbes (0/2331 muestras de fase aguda analizadas), Piura (0/1416 muestras), Ucayali (0/218 muestras), La Merced (0/1423 muestras), Lima (0/152 muestras) y Cusco (0/939 muestras) (figura 7).

De manera detallada, de 65 aislamientos de GRCV; 52 provienen del departamento de Loreto, donde 45 son de la provincia de Maynas (3 del distrito de Belén, 19 del distrito de Iquitos, 5 del distrito de Punchana y 18 del distrito de San Juan bautista) y 7 son de la provincia de Alto Amazonas (1 del distrito de Jeberos y 6 del distrito de Yurimaguas); 13 aislamientos de GRCV provienen de la ciudad de Puerto Maldonado, provincia de Tambopata, departamento de Madre de Dios.

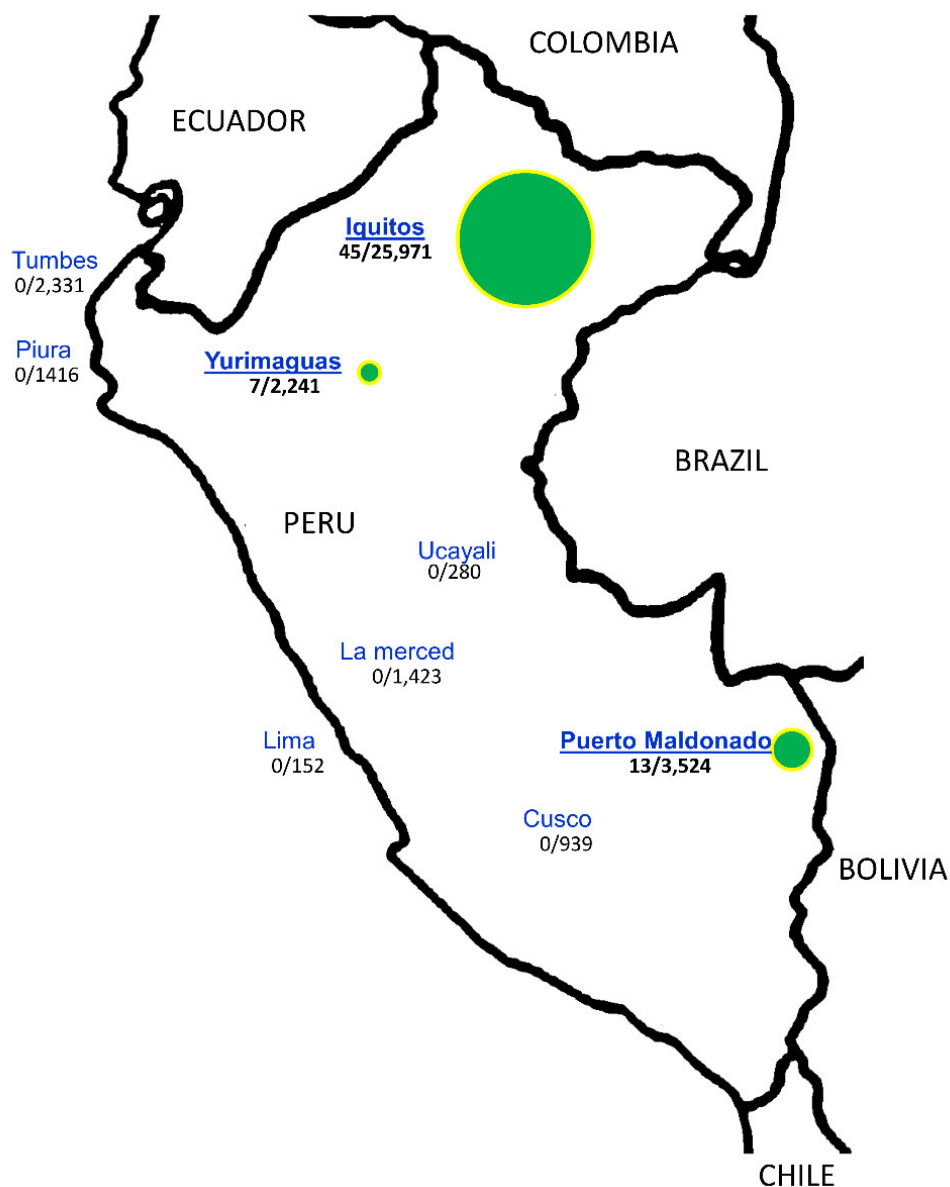


Figura 7. Distribución de las muestras de pacientes febriles en Perú.

Cantidad de muestras de pacientes en fase aguda analizados (denominador) y cantidad de virus del grupo C aislados (numerador). Los círculos verdes representan los lugares donde se aislaron los virus del grupo C y el tamaño es proporcional a la cantidad de aislamientos.

Los pacientes con infecciones con GRCVs comúnmente presentaron enfermedad febril indiferenciada, Los síntomas más comunes descritos en la mayoría de los pacientes fueron; malestar, dolor de cabeza, escalofríos, artralgia, mialgia, dolor retro ocular, dolor de huesos, astenia, inyección conjuntival, palidez, tos, faringitis, rash y expectoración. Entre las manifestaciones gastrointestinales frecuentes están la hiporexia, náuseas, dolor abdominal y vómitos (tabla 3).

La mediana de la edad de los pacientes infectados con GRCV fue de 25 años, el rango de edad fluctuó entre los 6 y 63 años de edad; 62% (40/65) fueron de género masculino y 38% (25/65) fueron de género femenino. Las principales actividades a las que se dedicaban son 19/65 (29%) estudiantes, 9/65 (14%) amas de casa, 6/65 (9%) obreros y otras actividades distribuidas en menor porcentaje (tabla 4). Las actividades observadas en las personas infectadas nos sugieren que las infecciones pudieron ocurrir en el ámbito urbano, cabe recordar que los vectores relacionados con las infecciones de GRCV están asociados a mosquitos del género *Culex*, en especial en el Perú donde se han aislado GRCV de mosquitos de este género (Turrel y col., 2005; Treangen y col., 2016). Los mosquitos *Culex* son consideradas cosmopolitas por su gran capacidad de adaptación a distintos nichos ecológicos, sus larvas pueden encontrarse desde aguas limpias y cristalinas a agua muy contaminadas con restos orgánicos, en estado adulto se adaptan a las variaciones de temperatura, estas características las hacen ser uno de los mosquitos de más amplia distribución y abundancia, tanto en ambientes rurales como urbanos.

Tabla 3. Principales manifestaciones clínicas de los pacientes infectados con virus del grupo C

Signos y síntomas	%
Malestar General	98.2%
Dolor De Cabeza	96.9%
Escalofríos	90.6%
Artralgia	84.1%
Mialgia	83.6%
Dolor de ojos	82.8%
Hiporexia	65.9%
Dolor De Huesos	63.2%
Nauseas	53.7%
Astenia	51.2%
Dolor abdominal	41.2%
Inyección conjuntival	34.6%
Palidez	31.7%
Tos	19.4%
Faringitis	16.3%
Vómitos	13.7%
Rash	13.5%
Expectoración	9.6%

Tabla 4. Datos demográficos de los pacientes infectados con virus del grupo C y año de aislamiento

Año	Cepa Viral	Departamento	Provincia	Distrito	Edad	Género	Ocupación
1995	IQT1726	Loreto	Maynas	Iquitos	40	Masculino	Empleado
1999	IQT9891	Loreto	Maynas	Iquitos	20	Masculino	Estudiante
1999	IQU0126	Loreto	Maynas	San Juan Bautista	11	Masculino	Estudiante
1999	IQU0212	Loreto	Maynas	Belén	17	Masculino	Militar
1999	IQU0250	Loreto	Maynas	San Juan Bautista	34	Femenino	Ama de casa
1999	IQU0540	Loreto	Maynas	San Juan Bautista	18	Femenino	Estudiante
1999	IQU1719	Loreto	Maynas	Iquitos	24	Masculino	Obrero
1999	IQU1840	Loreto	Maynas	San Juan Bautista	13	Femenino	Estudiante
1999	IQU2233	Loreto	Maynas	Iquitos	36	Femenino	Comerciante
2000	IQU2992	Loreto	Maynas	Belén	23	Femenino	Ama de casa
2000	FSL0167	Loreto	Maynas	San Juan Bautista	33	Masculino	Obrero
2001	FSL0512	Loreto	Maynas	San Juan Bautista	39	Masculino	Agricultor
2003	IQD5807	Loreto	Maynas	Iquitos	16	Femenino	Estudiante
2003	IQD5812	Loreto	Maynas	Iquitos	59	Masculino	Mecánico
2003	IQD5973	Loreto	Maynas	Iquitos	17	Femenino	Estudiante
2003	IQD6203	Loreto	Maynas	Iquitos	34	Masculino	Obrero
2004	FSL1270	Loreto	Alto Amazonas	Yurimaguas	20	Masculino	Chofer
2004	FSL1491	Loreto	Maynas	San Juan Bautista	24	Masculino	Obrero
2004	FSL1813	Loreto	Maynas	San Juan Bautista	24	Femenino	Ama de casa
2004	IQD8243	Loreto	Maynas	San Juan Bautista	16	Masculino	Estudiante
2004	IQD8658	Loreto	Maynas	Iquitos	48	Femenino	Ama de casa
2005	FSL1767	Loreto	Alto Amazonas	Yurimaguas	13	Masculino	Estudiante
2005	IQE1249	Loreto	Maynas	Iquitos	31	Femenino	Ama de casa
2006	IQE3121	Loreto	Maynas	San Juan Bautista	6	Femenino	Estudiante
2006	IQE3155	Loreto	Maynas	Iquitos	27	Masculino	Obrero
2006	FMD0783	Madre de Dios	Tambopata	Tambopata	21	Masculino	Estudiante
2006	SER6020	Loreto	Alto Amazonas	Jeberos	12	Masculino	Estudiante
2006	FLU3627	Loreto	Maynas	San Juan Bautista	27	Femenino	-
2006	FMD0845	Madre de Dios	Tambopata	Tambopata	38	Masculino	Estudiante
2006	IQE4172	Loreto	Maynas	Iquitos	19	Femenino	Estudiante
2006	FSL2923	Loreto	Alto Amazonas	Yurimaguas	59	Masculino	Docente
2007	FMD0996	Madre de Dios	Tambopata	Tambopata	21	Masculino	Empleado
2007	FMD1043	Madre de Dios	Tambopata	Tambopata	36	Masculino	Tec. INRENA
2007	FMD1113	Madre de Dios	Tambopata	Tambopata	15	Masculino	Estudiante
2007	MFI0919	Loreto	Maynas	Iquitos	25	Masculino	Concesionario
2007	IQE5082	Loreto	Maynas	Iquitos	20	Femenino	Ama de casa
2007	IQE5249	Loreto	Maynas	Iquitos	29	Masculino	Estudiante
2007	IQE5417	Loreto	Maynas	Punchana	27	Masculino	Mecánico
2007	FMD1643	Madre de Dios	Tambopata	Tambopata	25	Masculino	Minero
2007	FMD1684	Madre de Dios	Tambopata	Tambopata	21	Masculino	Obrero
2007	FMD1692	Madre de Dios	Tambopata	Tambopata	19	Masculino	Estudiante
2007	FMD1729	Madre de Dios	Tambopata	Tambopata	44	Femenino	Docente
2008	FMD1881	Madre de Dios	Tambopata	Tambopata	28	Masculino	Guarda Parque
2008	FMD1899	Madre de Dios	Tambopata	Tambopata	38	Masculino	Agricultor
2008	IQE7620	Loreto	Maynas	San Juan Bautista	14	Femenino	Estudiante
2008	IQE7743	Loreto	Maynas	San Juan Bautista	46	Femenino	Comerciante
2008	FMD2084	Madre de Dios	Tambopata	Tambopata	35	Masculino	Minero
2008	NFI0798	Loreto	Maynas	Punchana	36	Masculino	Militar
2009	IQE8988	Loreto	Maynas	San Juan Bautista	20	Femenino	Ama de casa
2009	FMD2329	Madre de Dios	Tambopata	Tambopata	22	Masculino	Minero
2009	IQE9621	Loreto	Maynas	Punchana	63	Femenino	Agricultor

(Continuado)

(Continuado)

Año	Cepa Viral	Departamento	Provincia	Distrito	Edad	Género	Ocupación
2009	FSL4095	Loreto	Alto Amazonas	Yurimaguas	50	Masculino	Empelado
2010	FSL4398	Loreto	Alto Amazonas	Yurimaguas	47	Femenino	Tec. Enfermería
2011	MIS1035	Loreto	Alto Amazonas	Yurimaguas	9	Masculino	Estudiante
2011	FPI02026	Loreto	Maynas	Iquitos	36	Femenino	Ama de casa
2011	FPI02066	Loreto	Maynas	San Juan Bautista	29	Masculino	-
2011	FPI02188	Loreto	Maynas	Punchana	32	Masculino	Prof. Salud
2011	FPI02271	Loreto	Maynas	San Juan Bautista	27	Masculino	Chofer
2011	FPI02289	Loreto	Maynas	Iquitos	19	Masculino	Militar
2011	FPI02450	Loreto	Maynas	San Juan Bautista	19	Femenino	Estudiante
2011	FPI02530	Loreto	Maynas	Iquitos	33	Femenino	Docente
2011	FPI02607	Loreto	Maynas	Belén	52	Femenino	Ama de casa
2011	FPI02660	Loreto	Maynas	Punchana	18	Masculino	Militar
2012	FPI3933	Loreto	Maynas	Iquitos	42	Femenino	-
2013	FPI5338	Loreto	Maynas	San Juan Bautista	17	Masculino	-

6.2 Diseño de *primers*

Empleando las secuencias nucleotídicas de los segmentos genómicos S, M y L obtenidas de 8 diferentes aislamientos (IQD5973, FSL2923, FMD0783, IQE3155, IQE7743, IQE7620, FMD1881, FMD2329) por el WRAIR (Hang y col., 2012; Hang y col., 2014) y secuencias nucleotídicas del segmento genómico S de 31 diferentes virus del grupo C depositadas en el banco de genes (*GenBank*) por Nunes y col. (2005), se desarrollaron 8 diferentes pares de *primers* (tabla 5).

Los *primers* diseñados fueron probados por RT-PCR. Del mismo modo, se probó el par de *primers* para el segmento genómico S, previamente empleados por Nunes y col. (2005) y designados como BUN-F (AGTAGTGTGCTCCAC) y BUN-R (AGTAGTGTACTIONCCAC) *forward* y *reverse* respectivamente.

El par de *primers* “GCGB-S177-F / GCGB-S404-R”, cuyo producto esperado fue de 220 pb aproximadamente, diseñadas empleando secuencias publicadas por Nunes y col. (2005) mostraron bandas muy inespecíficas cuando fueron ensayadas con producto de PCR de un aislamiento y una cepa referencial de GRCV (figura 8). Además, los *primers* “BUN-F / BUN-R” al ser ensayadas bajo las condiciones descritas por el autor (Nunes y col., 2005), no dieron ningún tipo de banda (dato no incluido).

Los pares de *primers* "GCN6-S282-F / GCN6-S838-R", "GCGBN6-S258-F / GCGBN6-S374-R" y "GCGBN6-S258-F+ / GCGBN6-S575-R" cuyos productos esperados fueron de 550 pb, 110 pb y 300 pb respectivamente, dieron bandas en sus respectivos tamaños, pero claramente se observó que mejor resultado se obtuvo con el par de *primer* "GCN6-S282-F y GCN6-S838-R" (figura 8).

Tabla 5. *Primers* diseñados para virus del grupo C

Nombre del Primer *	Secuencia de Primer (5' – 3')	Diseño del primer (Comentario) **
GCGB-S177-F	CAGACAATACATTTGAYCCDG	Con secuencias del <i>GenBank</i>
GCGB-S404-R	CGTAGTCAGGCAGTGGAAAT	Con secuencias del <i>GenBank</i>
GCN6-S282-F	AGGCTAAACAGAARCTSCGTAAGAG	Con secuencias del WRAIR
GCN6-S838-R	CATKGTRATKCCAAACTCCTTRA	Con secuencias del WRAIR
GCGBN6-S258-F	GARTBTTCTWCMTCMRYG	Con secuencias del WRAIR- <i>GenBank</i>
GCGBN6-S374-R	CNGGRWAATGNKTRTTAA	Con secuencias del WRAIR- <i>GenBank</i>
GCGBN6-S258-F+	GARTBTTCTWCMTCMRYGC	Con secuencias del WRAIR- <i>GenBank</i>
GCGBN6-S575-R	GSAARAAKGCNAGGTACAT	Con secuencias del WRAIR- <i>GenBank</i>
GCN6-M3306-F	TGYAARGAYATAATHAARCCWGA	Con secuencias del WRAIR
GCN6-M4108-R	TCRCTRITNCCDACTTCRAT	Con secuencias del WRAIR
GCN6-M136-F	AGRTGCTTTGAAGGHGGDGT	Con secuencias del WRAIR
GCN6-M901-R	TCRAACATHGADCCRCARAC	Con secuencias del WRAIR
GCN6-L3877-F	AGYYTRGCATGGGTVAGYATTGC	Con secuencias del WRAIR
GCN6-L4685-R	AAATCTYTYTTDATAGCARYAAATGTTTCWGG	Con secuencias del WRAIR
GCN6-L3853-F	GCWATMAARCAYGGWTGYCC	Con secuencias del WRAIR
GCN6-L4665-R	AAAKGTTTCWGGNATWGTYTYC	Con secuencias del WRAIR

* El nombre de los *primers* está dividido en 3 partes. El primero describe, el virus y la obtención de la secuencia. El segundo describe, el segmento genómico y la posición aproximada de alineamiento. Finalmente, el tercero refiere a la orientación del primer, *forward* (F) o *reverse* (R).

**Los *primers* fueron diseñados empleando las secuencias obtenidas por el WRAIR, por Nunes y col. (mostradas en la tabla como "*GenBank*") o ambas.

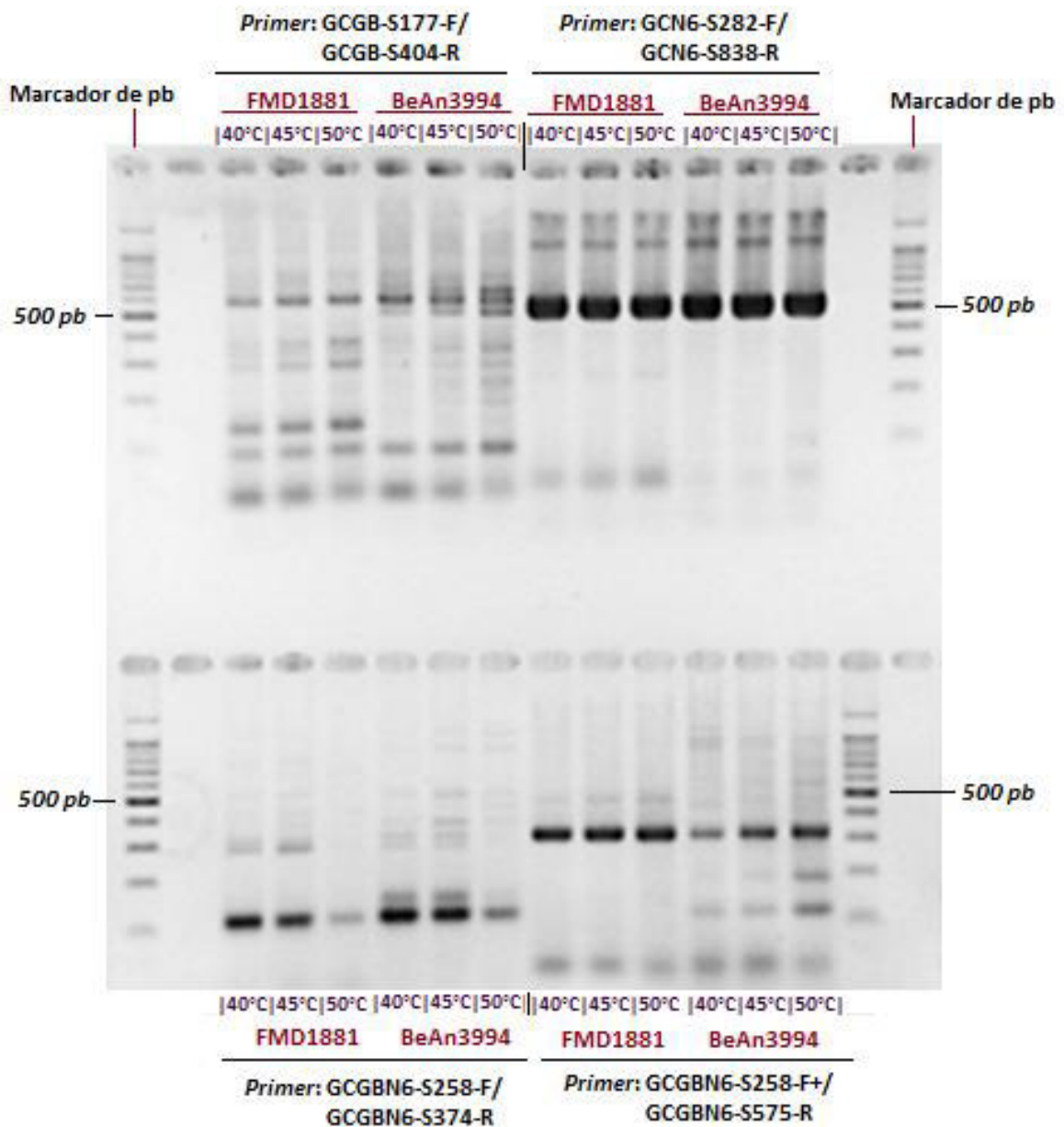


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR del segmento genómico S de GRCV ensayados con los *primers* diseñados.

GRCV aislamiento FMD1881 y cepa referencial CARV BeAn3994 ensayados con los *primers*: GCGB-S177-F/GCGB-S404-R, producto aproximado esperado 220 pb; GCN6-S282-F/GCN6-S838-R, producto aproximado esperado 550 pb; GCGBN6-S258-F/GCGBN6-S374-R, producto aproximado esperado 110 pb y GCGBN6-S258-F+/GCGBN6-S575-R, producto aproximado esperado 300 pb. Cada producto y cada *primer* fueron ensayados a 3 diferentes temperaturas de alineamiento (40 °C, 45 °C y 50 °C).

Los pares de *primers* diseñados para el segmento genómico M; “GCN6-M3306-F / GCN6-M4108-R” y “GCN6-M136-F / GCN6-M901-R” cuyos productos esperados fueron de 800 pb y 760 pb respectivamente, dieron bandas en sus respectivos tamaños, donde ambas dieron extra bandas, siendo el mejor con el par de *primers* “GCN6-M3306-F / GCN6-M4108-R” (figura 9).

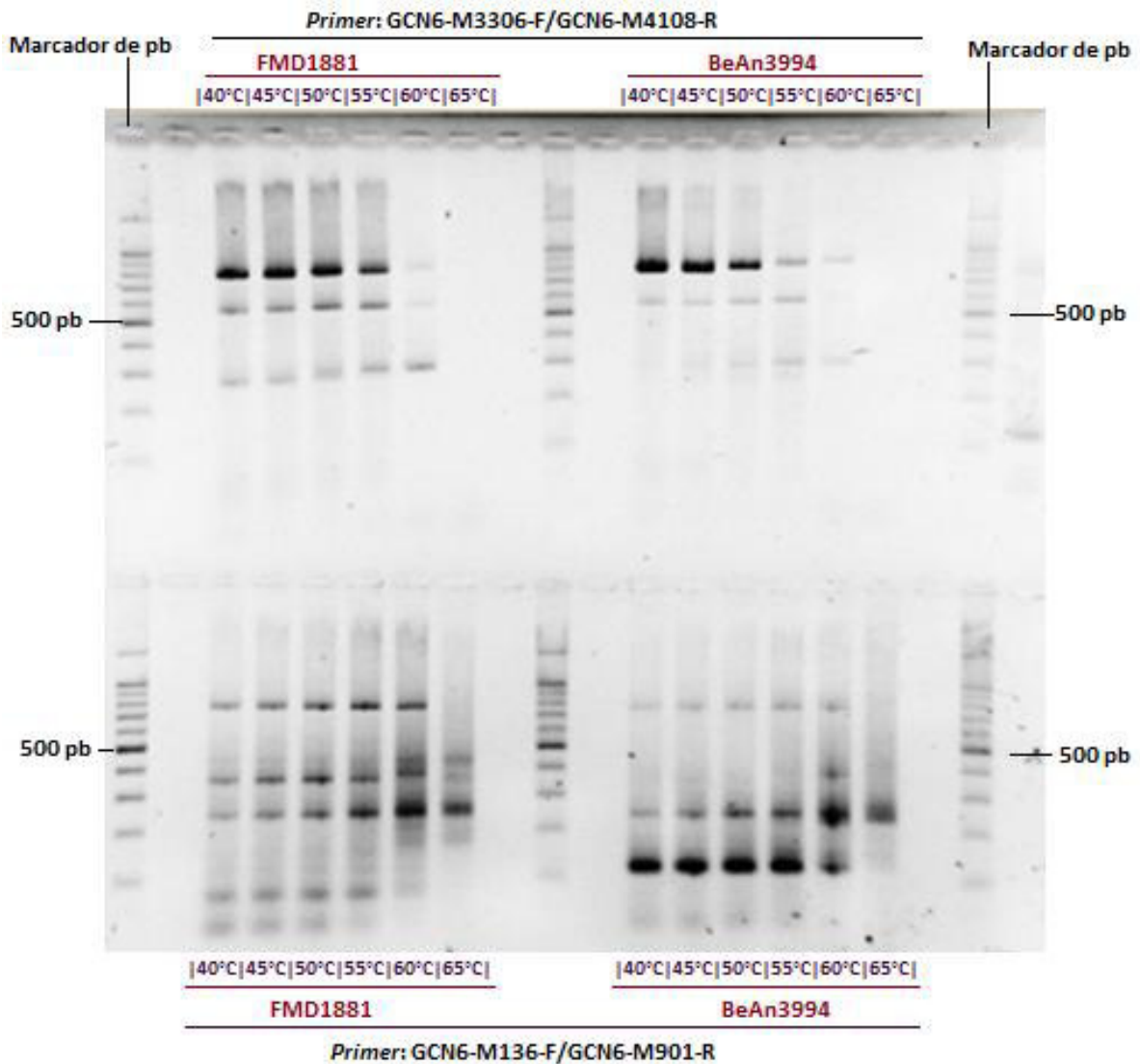


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR del segmento genómico M de GRCV ensayados con los *primers* diseñados.

GRCV aislamiento FMD1881 y cepa referencial CARV BeAn3994 ensayados con los *primers*: GCN6-M3306-F/GCN6-M4108-R, producto aproximado esperado 800 pb y GCN6-M136-F/GCN6-M901-R, producto aproximado esperado 760 pb. Los productos y los 2 pares de *primers* fueron ensayados a 6 diferentes temperaturas de alineamiento (40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C y 65 °C).

Los pares de *primers* diseñados para el segmento genómico L; “GCN6-L3877-F / GCN6-L4685-R” y “GCN6-L3853-F / GCN6-L4665-R” cuyos productos esperados fueron de 800 pb y 810 pb respectivamente, dieron bandas en sus respectivos tamaños, donde ambas dieron extra bandas, siendo el mejor con el par de *primers* “GCN6-L3877-F / GCN6-L4685-R” (figura 10).

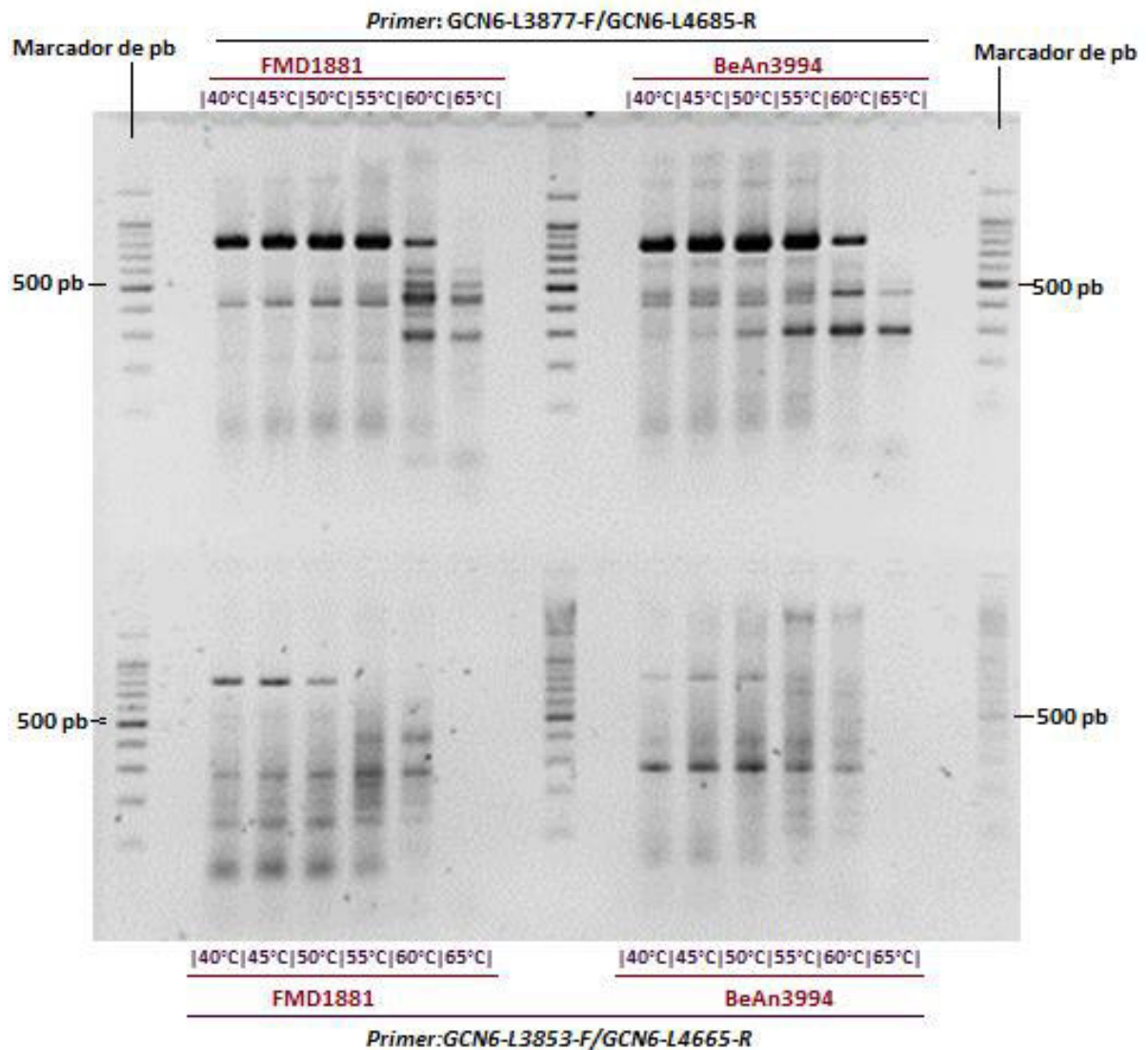


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR del segmento genómico L de GRCV ensayados con los *primers* diseñados.

GRCV aislamiento FMD1881 y cepa referencial CARV BeAn3994 ensayados con los *primers*: GCN6-L3877-F/GCN6-L4685-R, producto aproximado esperado 800 pb y GCN6-L3853-F/GCN6-L4665-R, producto aproximado 810 pb. Los productos y los 2 pares de *primers* fueron ensayados a 6 diferentes temperaturas de alineamiento (40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C y 65 °C).

6.3 Retro transcripción y amplificación de DNA complementario

La retro transcripción y amplificación de DNA complementario por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo empleando los siguientes pares de *primers*:

Para el segmento genómico S, el par de *primers* GCN6-S282-F (*forward*) y GCN6-S838-R (*reverse*), los cuales se alinean e inician la elongación, aproximadamente en las posiciones 282 y 834 del genoma S, con un producto de aproximadamente 550 pb, segmento que codifica parcialmente las proteínas N y NSs.

Para el segmento genómico M, el par de *primers* GCN6-M3306-F (*forward*) y GCN6-M4108-R (*reverse*), los cuales se alinean e inician la elongación, aproximadamente en las posiciones 3306 y 4108 del genoma M, con un producto de aproximadamente 800 pb, segmento que codifica parcialmente la poliproteína, correspondiente al sitio GC.

Para el segmento genómico L, el par de *primers* GCN6-L3877-F (*forward*) y GCN6-L4685-R (*reverse*), los cuales se alinean e inician la elongación, aproximadamente en la posición 3877 y 4685 del genoma L, con un producto de aproximadamente 800 pb, segmento que codifica parcialmente el RdRp.

Los RNA extraídos de todos los GRCV aislados y cepas referenciales; fueron procesados y sus productos finales se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa (figuras 11 y 12). Cabe resaltar que las bandas obtenidas con los productos del segmento genómico S fueron más intensos y por lo general solo dieron una banda, mientras que las bandas obtenidas con los productos del segmento genómico M y L fueron bastante claras, pero presentaron en su mayoría extra bandas, por ello fue necesario cortar los geles con las bandas adecuadas para su secuenciación.

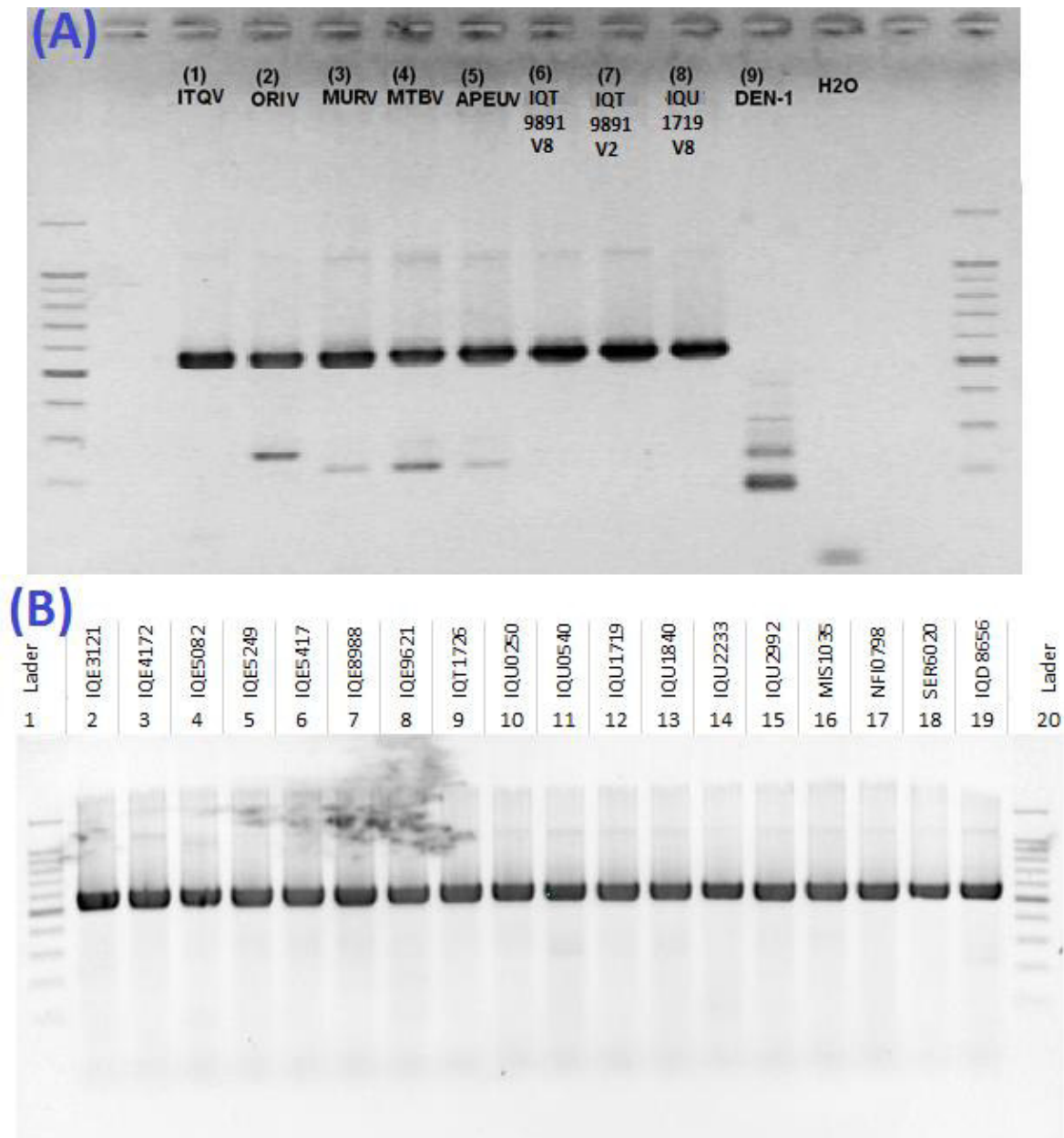


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR del segmento genómico S de algunos GRCV.

(A) Producto de PCR de los virus del grupo C: ITQV PE00036, ORIV BeAn17, MURV BeAn974, MTBV BeAn15, APEUV848, IQT9891 V-8, IQT9891 V-2, IQU1719 V-8 y DENV-1.

(B) Producto de PCR de algunos aislamientos de virus del grupo C.

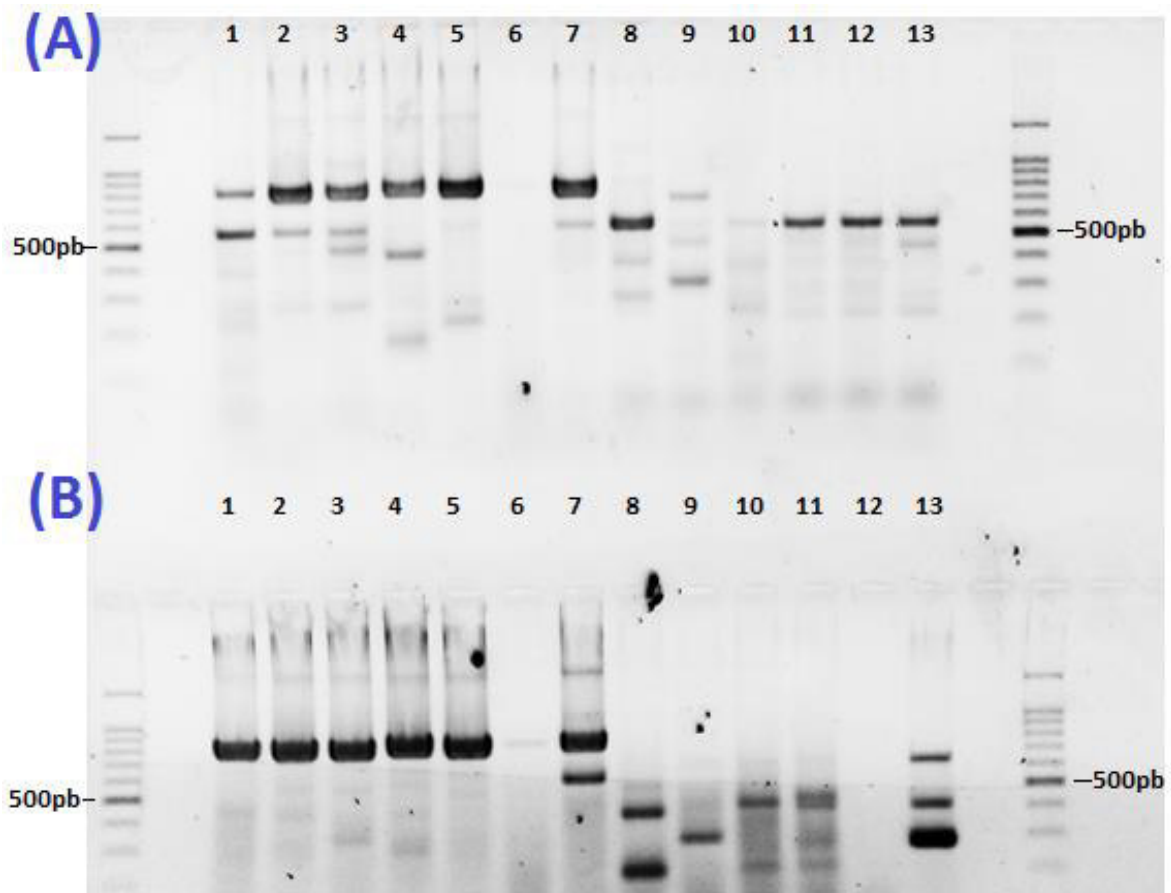


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR de los segmentos genómicos M y L de algunos GRCV.

(A) Producto de PCR de los GRCVs, segmento genómico M.

(B) Producto de PCR de los GRCVs, segmento genómico L.

Los números corresponden: 1 = ITQV PE00036, 2 = ORIV BeAn17, 3 = MURV BeAn974, 4 = MTBV BeAn15, 5 = APEUV BeAn848, 6 = Suero Humano, 7 = GRCV, 8 = MAYV, 9 = DENV-1, 10 = células Vero, 11 = MAGV, 12= Muestra desconocida, 13 = MAGV.

6.4 Secuenciación y análisis filogenético

Fueron obtenidos productos de PCR de 65 aislamientos y 6 GRCV referenciales y secuenciados parcialmente en sus 3 segmentos genómicos (S, M y L), todas las secuencias fueron ingresadas al GenBank (tablas 2 y 6). Cabe mencionar que de los 65 aislamientos de GRCV, fueron usados secuencias completas de 8 aislamientos de las cuales 4 fueron previamente ingresadas al

banco de genes (Hang y col., 2012; Hang y col., 2014), el resto fue ingresado como parte del presente trabajo.

Tabla 6. Lista de aislamientos de GRCV y numero de ingreso al GenBank

Cepa	Numero de ingreso al GenBank		
	Segmento S	Segmento M	Segmento L
IQT1726	MH052000	MH052067	MH052134
IQT9891	MH052001	MH052068	MH052135
IQU0126	MH052002	MH052069	MH052136
IQU0212	MH052003	MH052070	MH052137
IQU0250	MH052004	MH052071	MH052138
IQU0540	MH052005	MH052072	MH052139
IQU1719	MH052006	MH052073	MH052140
IQU1840	MH052007	MH052074	MH052141
IQU2233	MH052008	MH052075	MH052142
IQU2992	MH052009	MH052076	MH052143
FSL0167	MH052010	MH052077	MH052144
FSL0512	MH052011	MH052078	MH052145
IQD5807	MH052012	MH052079	MH052146
IQD5812	MH052013	MH052080	MH052147
IQD5973	KF254789	KF254788	KF254787
IQD6203	MH052014	MH052081	MH052148
FSL1270	MH052015	MH052082	MH052149
FSL1491	MH052016	MH052083	MH052150
FSL1813	MH052017	MH052084	MH052151
IQD8243	MH052018	MH052085	MH052152
IQD8658	MH052019	MH052086	MH052153
FSL1767	MH052020	MH052087	MH052154
IQE1249	MH052021	MH052088	MH052155
IQE3121	MH052022	MH052089	MH052156
IQE3155	MH052023	MH052090	MH052157
FMD0783	KF254795	KF254794	KF254793
SER6020	MH052024	MH052091	MH052158
FLU3627	MH052025	MH052092	MH052159
FMD0845	MH052026	MH052093	MH052160
IQE4172	MH052027	MH052094	MH052161
FSL2923	KF254792	KF254791	KF254790
FMD0996	MH052028	MH052095	MH052162
FMD1043	MH052029	MH052096	MH052163
FMD1113	MH052030	MH052097	MH052164

(Continuado)

(Continuado)

Cepa	Numero de ingreso al GenBank		
	Segmento S	Segmento M	Segmento L
MFI0919	MH052031	MH052098	MH052165
IQE5082	MH052032	MH052099	MH052166
IQE5249	MH052033	MH052100	MH052167
IQE5417	MH052034	MH052101	MH052168
FMD1643	MH052035	MH052102	MH052169
FMD1684	MH052036	MH052103	MH052170
FMD1692	MH052037	MH052104	MH052171
FMD1729	MH052038	MH052105	MH052172
FMD1881	MH052039	MH052106	MH052173
FMD1899	MH052040	MH052107	MH052174
IQE7620	KF254783	KF254782	JN157805
IQE7743	MH052041	MH052108	MH052175
FMD2084	MH052042	MH052109	MH052176
NFI0798	MH052043	MH052110	MH052177
IQE8988	MH052044	MH052111	MH052178
FMD2329	MH052045	MH052112	MH052179
IQE9621	MH052046	MH052113	MH052180
FSL4095	MH052047	MH052114	MH052181
FSL4398	MH052048	MH052115	MH052182
MIS1035	MH052049	MH052116	MH052183
FPI02026	MH052050	MH052117	MH052184
FPI02066	MH052051	MH052118	MH052185
FPI02188	MH052052	MH052119	MH052186
FPI02271	MH052053	MH052120	MH052187
FPI02289	MH052054	MH052121	MH052188
FPI02450	MH052055	MH052122	MH052189
FPI02530	MH052056	MH052123	MH052190
FPI02607	MH052057	MH052124	MH052191
FPI02660	MH052058	MH052125	MH052192
FPI03933	MH052059	MH052126	MH052193
FPI05338	MH052060	MH052127	MH052194

6.4.1 Análisis de las secuencias del segmento genómico S

Las secuencias parciales obtenidas del segmento genómico S, al ser analizadas filogenéticamente (figura 13) fueron agrupadas en 2 clados principales. El clado I, compuesta por 49 aislamientos (incluyendo la cepa IQT9646), todas provenientes del noreste y sureste de la amazonia peruana y las cepas referenciales ITQV PE00036, CARV BeAn3394 y MADV BT4075. Los aislamientos

del clado I, comparten entre el 85.8 % - 88.4 % de identidad en nucleótidos y 96.4 % - 97.1 % de identidad en aminoácidos con CARV BeAn3394 (tabla 7). A su vez el clado I agrupa 2 linajes; el linaje 1 agrupa 35 aislamientos provenientes del noreste de la amazonía peruana (Iquitos y Yurimaguas), mientras que el linaje 2 agrupa, 1 aislamiento del noreste (Iquitos) y 13 aislamientos del sureste de la amazonia peruana (Puerto Maldonado). Los virus ITQV PE00036 y MADV BT4075, comparten con CARV BeAn3394, 85.8 % y 86.0 % de identidad en nucleótidos respectivamente y 95.7 % y 98.5 % de identidad en aminoácidos respectivamente.

El clado II, compuesta por 17 aislamientos del noreste de la amazonia peruana y las cepas referenciales, ORIV BeAn17, MURV BeAn974, APEU BeAn848 y MTBV BeAn15. Los aislamientos comparten entre el 83.0 % - 84.4 % de identidad en nucleótidos y 97.1 % de identidad en aminoácidos con MTBV BeAn15. Los virus MURV BeAn974, ORIV BeAn17 y APEUV BeAn848, comparten con MTBV BeAn15, el 81.3 %, 82.5 % y 86.0 % de identidad en nucleótidos respectivamente y 96.4 %, 96.4 % y 98.5 % de identidad en aminoácidos respectivamente.

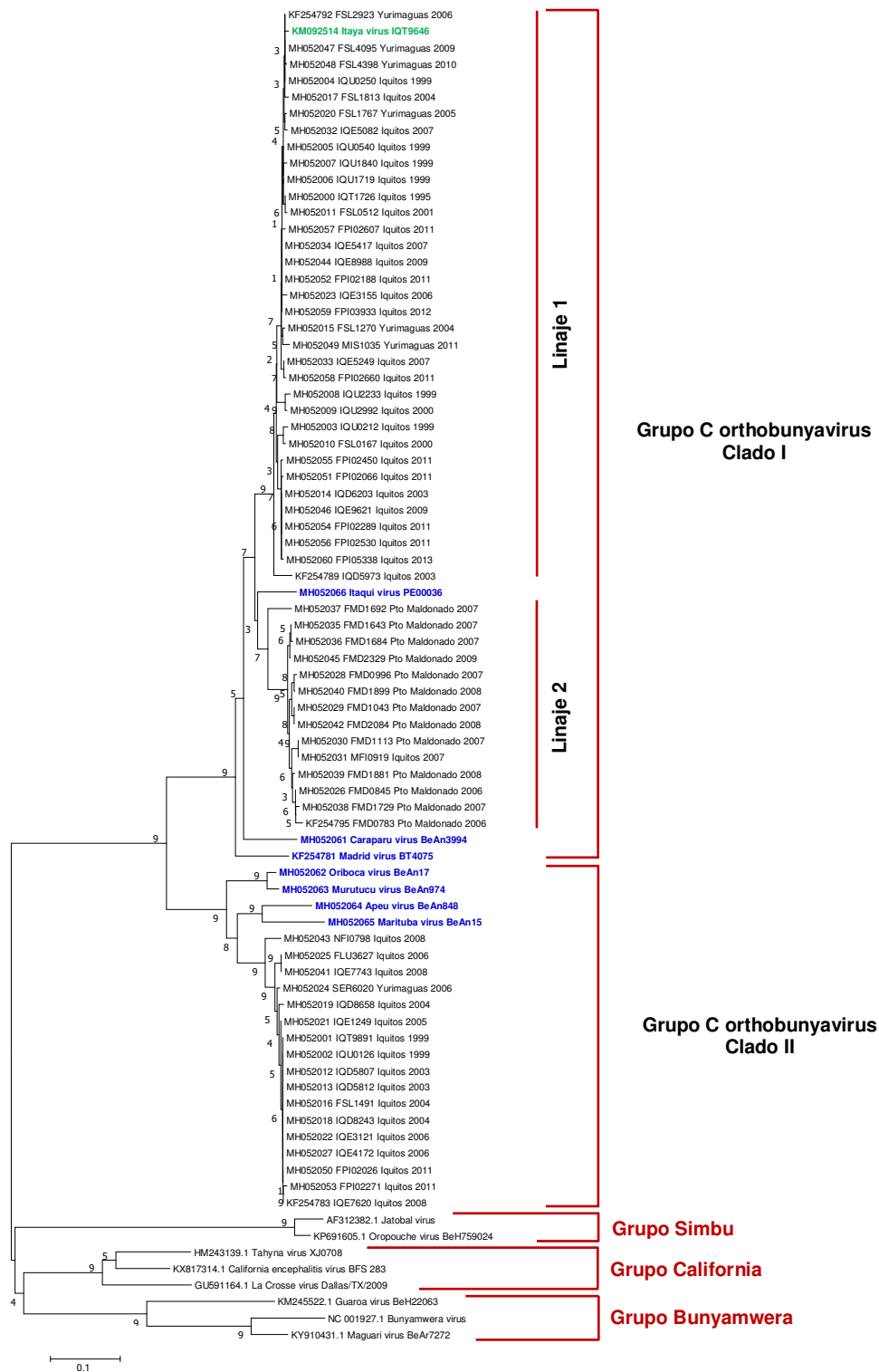


Figura 13. Análisis filogenético de secuencias parciales del segmento genómico S de GRCV.

El árbol filogenético fue construido usando el método de Neighbor-Joining y las distancias fueron calculadas usando Kimura 2-parametros. Valores de Bootstrap fueron calculadas en base 1000 réplicas. Miembros de los grupos serológicos Simbu, California y Bunyamwera fueron usados como grupos externos.

Tabla 7. Porcentaje de identidad en base a secuencias de nucleótidos y aminoácidos del segmento genómico S, de algunos aislamientos y virus referenciales del grupo C

	CLADO I											CLADO II							
	Linage 1					Linage 2													
	FSL4095	IQU1719	FPI02607	IQE8988	IQU2233	IQTV PE00036	FMD1692	FMD1043	FMD2084	MFI919	CARV BeAn3994	MADV BT4075	ORIV BeAn17	MURV BeAn 974	APEUV BeAn848	MTBV BeAnV 15	NFI0798	FLU3627	IQD8658
FSL4095	100	100	100	100	98.5	98.5	95.7	95.7	95.0	97.1	95.7	74.4	74.4	75.1	75.8	75.1	75.1	75.1	75.1
IQU1719	99.7	100	100	100	98.5	98.5	95.7	95.7	95.0	97.1	95.7	74.4	74.4	75.1	75.8	75.1	75.1	75.1	75.1
FPI02607	99.0	99.2	100	100	98.5	98.5	95.7	95.7	95.0	97.1	95.7	74.4	74.4	75.1	75.8	75.1	75.1	75.1	75.1
IQE8988	99.5	99.7	99.5	100	98.5	98.5	95.7	95.7	95.0	97.1	95.7	74.4	74.4	75.1	75.8	75.1	75.1	75.1	75.1
IQU2233	96.9	97.1	96.9	97.4	98.5	98.5	95.7	95.7	95.0	97.1	95.7	74.4	74.4	75.1	75.8	75.1	75.1	75.1	75.1
IQTV PE00036	91.0	90.8	90.0	90.5	90.8	98.5	95.7	95.7	95.0	98.5	95.7	75.1	75.1	75.8	76.5	75.8	75.8	75.8	75.8
FMD1692	91.7	91.5	91.2	91.2	90.3	90.0	97.1	97.1	96.4	97.1	95.7	75.1	75.1	75.8	76.5	75.8	75.8	75.8	75.8
FMD1043	91.0	90.8	90.5	90.5	90.8	90.8	93.3	100	99.2	97.1	94.3	75.1	75.1	75.8	76.5	75.8	75.8	75.8	75.8
FMD2084	91.0	90.8	90.5	90.5	90.8	90.8	93.3	100	99.2	97.1	94.3	75.1	75.1	75.8	76.5	75.8	75.8	75.8	75.8
MFI919	90.5	90.3	90.0	90.0	90.8	90.3	92.4	98.1	98.1	96.4	93.6	75.1	75.1	75.8	76.5	75.8	75.8	75.8	75.8
CARV BeAn3994	88.4	88.2	87.5	87.9	87.2	86.0	87.7	86.0	86.0	86.7	95.7	75.1	75.1	75.8	76.5	75.8	75.8	75.8	75.8
MADV BT4075	87.2	87.0	86.7	86.7	86.3	83.9	85.8	84.4	84.4	84.6	85.8	73.7	73.7	73.7	75.1	74.4	74.4	74.4	74.4
ORIV BeAn17	73.3	73.5	73.8	73.8	73.5	72.8	73.8	75.0	75.0	74.5	72.1	70.7	100	95.0	96.4	96.4	96.4	96.4	96.4
MURV BeAn974	73.1	73.3	73.5	73.5	73.3	72.4	73.3	75.2	75.2	74.2	70.0	69.5	97.1	95.0	96.4	96.4	96.4	96.4	96.4
APEUV BeAn848	70.2	70.0	69.8	69.8	70.0	71.2	71.6	71.6	71.9	73.5	69.8	82.7	81.8	98.5	95.7	95.7	95.7	95.7	95.7
MTBV BeAn15	69.1	68.8	69.1	69.1	69.1	71.6	70.9	70.2	70.2	70.9	69.5	70.7	82.5	81.3	86.0	97.1	97.1	97.1	97.1
NFI0798	73.3	73.1	73.3	73.3	72.8	72.8	73.8	74.0	74.0	73.8	72.6	70.0	87.2	86.5	85.1	84.4	100	100	100
FLU3627	73.8	73.5	73.8	73.3	73.1	72.8	74.2	74.0	74.0	72.8	71.4	70.9	86.0	86.7	84.1	83.0	95.5	100	100
IQD8658	72.8	73.1	73.3	72.8	73.5	72.4	73.8	73.5	73.5	73.3	71.4	71.9	86.5	86.7	84.1	84.4	95.5	98.1	100
IQT9891	73.3	73.1	73.3	72.8	72.6	72.4	74.7	74.0	74.0	73.3	71.9	71.4	86.0	86.3	84.6	83.9	95.9	98.5	99.0

Los valores en la parte inferior izquierda representan los porcentajes de identidad para nucleótidos y los valores en la parte superior derecha representan los porcentajes de identidad para aminoácidos. Los GRCV referenciales están en negrita. El porcentaje de identidad fue calculado usando 420 nucleótidos y 141 amino ácidos correspondientes parcialmente a las proteínas N y NSs.

6.4.2 Análisis de las secuencias del segmento genómico M

Las secuencias parciales obtenidas del segmento genómico M, analizadas filogenéticamente (figura 14) fueron agrupadas en 3 clados. El clado I, compuesta por 47 aislamientos (incluyendo la cepa IQT9646), provenientes del noreste y sureste de la amazonia peruana y las cepas referenciales, CARV BeAn3394, APEUV BeAn848 y MADV BT4075. Los aislamientos del clado I, comparten entre el 78.8 % - 84.1 % de identidad en nucleótidos y 90.2 % - 98.7 % de identidad en aminoácidos con CARV BeAn3394 (tabla 8). A su vez el clado I agrupa 3 linajes; el linaje 1 agrupa 30 aislamientos del noreste de la amazonia peruana (Iquitos y Yurimaguas), el linaje 2 agrupa 11 aislamientos del sureste de la amazonia peruana (Puerto Maldonado) y el linaje 3 agrupa 6 aislamientos del noreste y sureste de la amazonia peruana. Los virus MADV BT4075 y APEUV BeAn848, comparten con CARV BeAn3394, 78.0 % y 81.1 % de identidad en nucleótidos respectivamente y 88.9 % y 93.8 % de identidad en aminoácidos respectivamente.

El clado II, compuesta por 17 aislamientos del noreste de la amazonia peruana y las cepas referenciales, MURV BeAn974 y MTBV BeAn15. Los aislamientos comparten entre el 80.6 % - 81.7 % de identidad en nucleótidos y 95.1 % - 95.5 % de identidad en aminoácidos con MTBV BeAn15. El Virus MURV BeAn974 comparte con MTBV BeAn15 el 77.1 % de identidad en nucleótidos, al igual que APEUV BeAn848, CARV BeAn3394 y otros aislamientos, pero muestra 91.0 % de identidad en aminoácidos, a diferencia de CARV BeAn3394 y APEUV BeAn848, que comparte el 85.3 % y 86.9 % de identidad en aminoácidos respectivamente.

El clado III, solo compuesta por 2 aislamientos del noreste y sureste de la amazonia peruana y las cepas referenciales ITQV PE00036 y ORIV BeAn17. Estos aislamientos comparten entre el 93.9 % - 97.9 % de identidad en nucleótidos y 99.1 % - 100.0 % de identidad en aminoácidos con la cepa ITQV PE00036; mientras que con el virus ORIV BeAn17 los 2 aislamientos comparten entre el 72.7 % - 73.3 % de identidad en nucleótidos y 86.5 % - 86.9 % de identidad en aminoácidos.

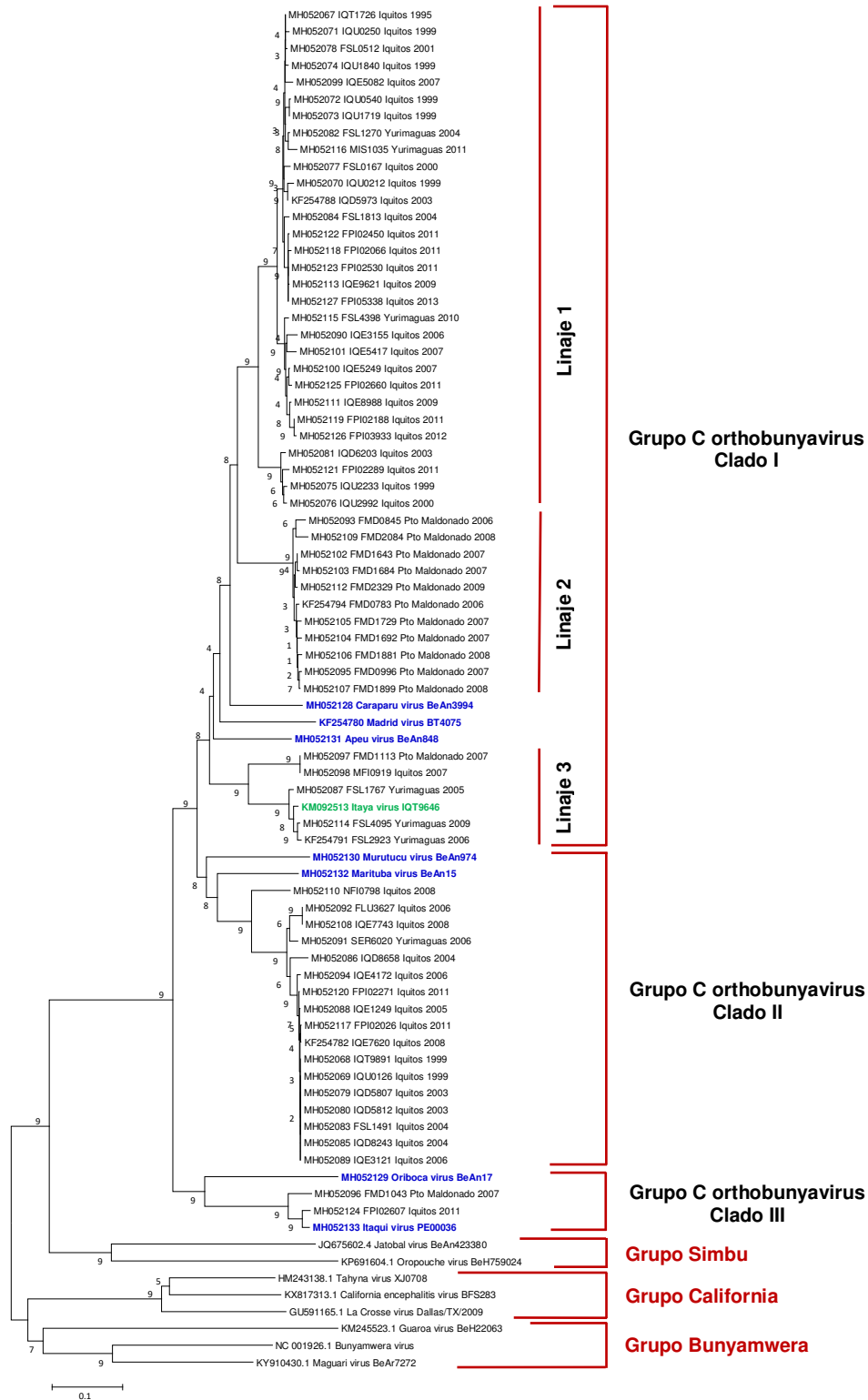


Figura 14. Análisis filogenético de secuencias parciales del segmento genómico M de GRCV.

El árbol filogenético fue construido usando el método de Neighbor-Joining y las distancias fueron calculadas usando Kimura 2-parameters. Valores de Bootstrap fueron calculadas en base 1000 réplicas. Miembros de los grupos serológicos Simbu, California y Bunyamwera fueron usados como grupos externos.

Tabla 8. Porcentaje de identidad en base a secuencias de nucleótidos y aminoácidos del segmento genómico M, de algunos aislamientos y virus referenciales del grupo C

	CLADO I										CLADO II					CLADO III			
	Linage 1			Linage 2			Linage 3												
	IQU1719	IQE8988	IQU2233	FMD2084	FMD1692	CARV BeAn3994	MADV BT4075	APEUV BeAn848	MF10919	FSL4095	MURV BeAn974	MTBV BeAn15	NFI0798	FLU3627	IQD8658	IQT9891	ORIV BeAn17	FMD1043	TTQV PE00036
IQU1719	100	100	99.5	100	98.7	89.7	94.6	91.8	91.0	85.7	86.5	86.5	86.5	86.1	86.5	73.4	73.4	73.8	73.8
IQE8988	96.6	100	99.5	100	98.7	89.7	94.6	91.8	91.0	85.7	86.5	86.5	86.5	86.1	86.5	73.4	73.4	73.8	73.8
IQU2233	92.5	91.5	99.5	100	98.7	89.7	94.6	91.8	91.0	85.7	86.5	86.5	86.5	86.1	86.5	73.4	73.4	73.8	73.8
FMD2084	84.6	84.5	86.7	99.5	98.3	89.3	94.2	92.2	91.4	85.7	86.5	86.5	86.5	86.1	86.5	73.4	73.4	73.8	73.8
FMD1692	85.3	85.2	88.0	97.1	98.7	89.7	94.6	91.8	91.0	85.7	86.5	86.5	86.5	86.1	86.5	73.4	73.4	73.8	73.8
CARV BeAn3994	83.6	83.3	84.0	82.1	82.7	88.9	93.8	91.0	90.2	84.8	85.3	85.7	85.7	85.3	85.7	73.8	73.4	73.8	73.8
MADV BT4075	79.9	80.2	78.9	78.3	77.7	78.0	88.9	90.6	90.2	84.4	86.1	86.5	86.5	85.7	85.7	73.4	73.0	73.4	73.4
APEUV BeAn848	81.4	81.1	80.2	80.7	80.7	81.1	77.5	91.8	91.0	86.1	86.9	87.3	87.3	87.7	87.3	73.8	75.1	74.6	74.6
MF10919	79.8	79.1	79.5	77.2	77.7	78.8	76.9	78.4	97.5	86.1	86.1	86.5	86.5	86.5	86.1	73.8	75.9	75.5	75.5
FSL4095	79.5	79.2	80.0	78.7	77.9	79.1	79.2	80.2	87.3	86.1	86.5	87.7	87.7	87.7	87.3	73.0	75.1	74.6	74.6
MURV BeAn974	76.0	75.6	75.3	76.5	75.4	76.8	75.6	77.3	75.0	77.2	91.0	90.6	90.6	91.0	90.2	73.4	73.8	73.4	73.4
MTBV BeAn15	76.6	76.4	76.8	77.2	76.9	77.1	75.4	77.1	77.7	77.3	77.1	95.5	95.5	95.1	95.1	72.2	73.0	73.4	73.4
NFI0798	78.7	77.9	77.2	75.7	76.0	75.6	76.0	77.1	79.1	77.7	77.3	80.6	100	99.1	99.1	72.2	73.0	73.4	73.4
FLU3627	76.6	76.8	76.5	75.0	74.7	76.5	76.5	77.6	76.9	77.7	77.9	81.7	88.4	99.1	99.1	72.2	73.0	73.4	73.4
IQD8658	76.2	76.5	76.1	74.9	74.1	75.7	75.3	78.3	76.0	76.8	77.3	80.8	88.6	94.7	99.1	73.0	73.0	72.6	72.6
IQT9891	77.1	77.1	76.9	74.7	74.5	76.6	75.7	78.3	76.4	77.3	78.1	81.1	89.0	96.4	96.6	72.2	72.2	72.6	72.6
ORIV BeAn17	68.5	68.0	68.5	68.6	68.0	68.4	70.8	71.2	69.5	69.1	69.7	71.8	69.7	71.1	70.4	70.5	86.9	86.5	86.5
FMD1043	71.6	71.4	71.8	71.0	71.4	68.9	68.5	70.7	69.2	70.5	69.3	69.5	72.2	70.8	70.4	70.7	73.3	99.1	99.1
ITQV PE00036	71.6	71.5	71.9	70.0	71.2	69.3	69.2	70.5	69.5	69.2	70.3	69.1	71.2	72.3	71.4	71.9	72.4	93.9	100
FPI02607	71.5	71.4	71.9	69.6	70.8	69.1	68.8	71.1	69.5	69.3	69.6	69.6	71.4	72.3	71.9	72.2	72.7	94.0	97.9

Los valores en la parte inferior izquierda representan los porcentajes de identidad para nucleótidos y los valores en la parte superior derecha representan los porcentajes de identidad para aminoácidos. Los GRCV referenciales están en negrita. El porcentaje de identidad fue calculado usando 738 nucleótidos y 245 amino ácidos correspondientes parcialmente a la poliproteína.

6.4.3 Análisis de las secuencias del segmento genómico L

Las secuencias parciales obtenidas del segmento genómico L, analizadas filogenéticamente (figura 15) muestran una agrupación muy similar al segmento genómico S, con 2 clados y la misma distribución de los aislamientos y cepas referenciales de los virus del grupo C en ambos clados.

Los aislamientos del clado I, comparten entre el 82 % - 84.4 % de identidad en nucleótidos y 96.5 % - 97.8 % de identidad en aminoácidos con CARV BeAn3394 (tabla 9). Al igual que el segmento genómico S, el clado I agrupa 2 linajes; el linaje 1 agrupa 35 aislamientos provenientes del noreste de la amazonia peruana (Iquitos y Yurimaguas), mientras que el linaje 2 agrupa, 1 aislamiento del noreste de la amazonia (Iquitos) y 13 aislamientos del sureste de la amazonia peruana (Puerto Maldonado).

El clado II comprende de 17 aislamientos del noreste de la amazonia peruana y comparten entre el 79.8 % - 81.1 % de identidad en nucleótidos y 94.8 % - 96.1 % de identidad en aminoácidos con MTBV BeAn15.

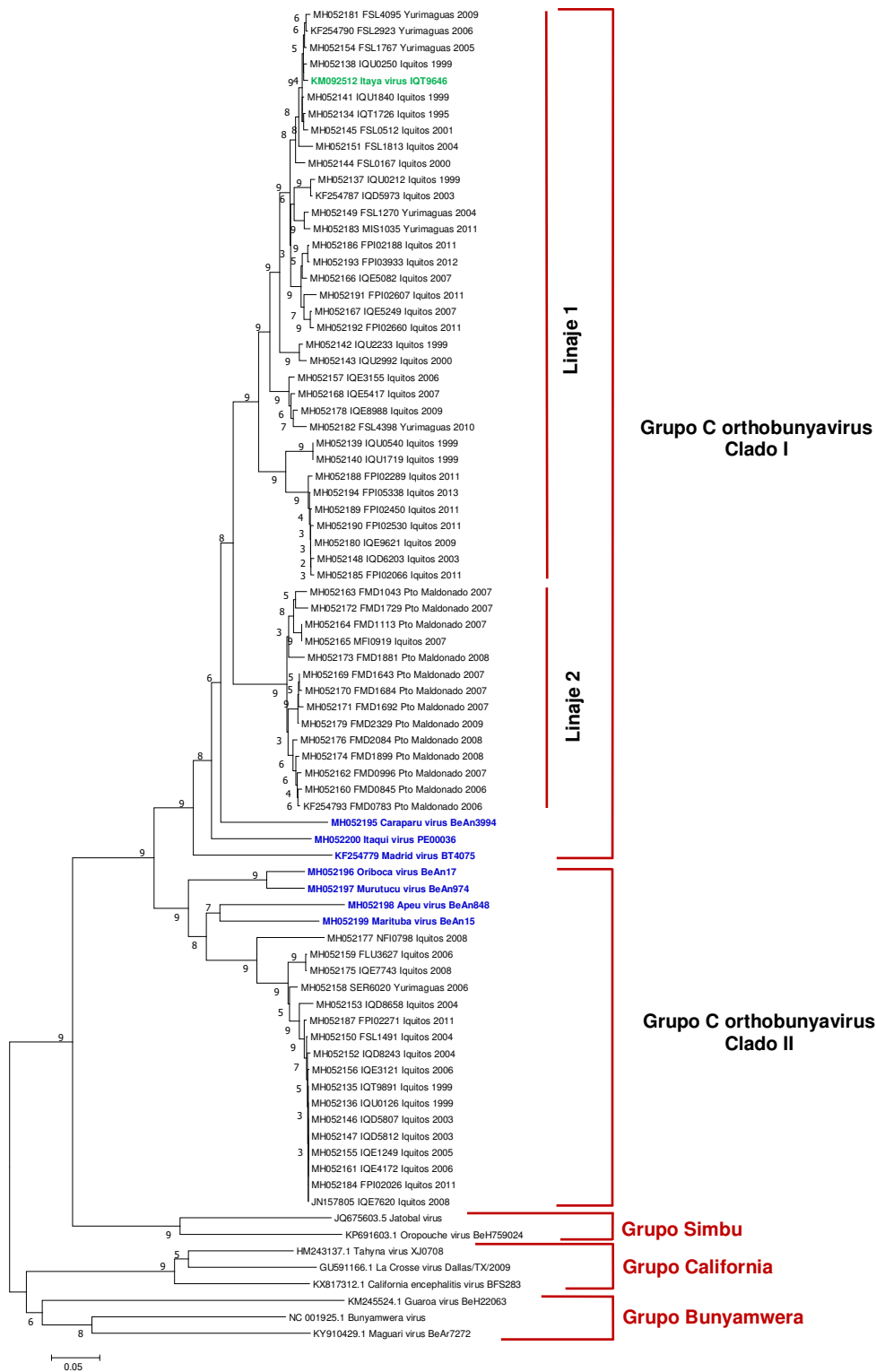


Figura 15. Análisis filogenético de secuencias parciales del segmento genómico L de GRCV.

El árbol filogenético fue construido usando el método de Neighbor-Joining y las distancias fueron calculadas usando Kimura 2-parameters. Valores de Bootstrap fueron calculados en base 1000 réplicas. Miembros de los grupos serológicos Simbu, California y Bunyamwera fueron usados como grupos externos.

Tabla 9. Porcentaje de identidad en base a secuencias de nucleótidos y aminoácidos del segmento genómico L, de algunos aislamientos y virus referenciales del grupo C

	CLADO I										CLADO II									
	Linage 1					Linage 2														
	FPI02607	FSL4095	IQU2233	IQE8988	IQU1719	FMD2084	FMD1692	FMD1043	MFI0919	CARV BeAn3994	IQTV PE00036	MADV BT4075	ORIV BeAn17	MURV BeAn974	MTBV BeAn15	APEUV BeAn848	NFI0798	FLU3627	IQD8658	IQT9891
FPI02607		99.5	99.5	99.5	99.5	98.7	98.2	98.7	98.7	97.4	97.8	94.8	82.3	82.7	81.8	80.1	81.4	80.6	81.0	81.0
FSL4095	95.4		99.1	99.1	99.1	98.7	98.2	98.7	98.7	97.4	97.8	94.8	82.3	82.7	81.8	80.1	81.4	80.6	81.0	81.0
IQU2233	94.2	94.8		100	99.1	98.2	97.8	98.2	98.2	96.9	97.4	95.2	81.8	82.3	81.4	79.7	81.0	80.1	80.6	80.6
IQE8988	93.2	93.8	94.4		99.1	98.2	97.8	98.2	98.2	96.9	97.4	95.2	81.8	82.3	81.4	79.7	81.0	80.1	80.6	80.6
IQU1719	89.2	90.4	90.7	90.8		98.2	97.8	98.2	98.2	97.8	97.4	94.8	82.3	82.7	81.8	80.1	81.4	80.6	81.0	81.0
FMD2084	87.7	87.1	86.7	88.8	85.8		99.5	100	100	96.9	98.2	95.2	82.3	82.7	81.8	80.6	81.4	80.6	81.0	81.0
FMD1692	87.1	86.5	86.4	88.5	84.8	97.7		99.5	99.5	96.9	98.2	95.6	82.3	82.7	81.8	80.6	81.4	80.6	81.0	81.0
FMD1043	87.1	86.2	85.8	88.0	84.5	96.2	96.4		100	96.9	98.2	95.2	82.3	82.7	81.8	80.6	81.4	80.6	81.0	81.0
MFI0919	87.4	86.5	86.1	89.1	85.1	97.1	97.0	97.7		96.9	98.2	95.2	82.3	82.7	81.8	80.6	81.4	80.6	81.0	81.0
CARV BeAn3994	83.0	82.8	82.8	84.1	83.8	83.7	83.1	82.8	83.5		96.9	94.3	81.8	82.3	81.4	80.1	81.0	80.1	80.6	80.6
IQTV PE00036	82.8	82.2	83.4	83.0	82.0	83.1	82.8	83.1	83.1	80.4		94.8	81.8	82.3	81.4	80.1	81.0	80.1	80.6	80.6
MADV BT4075	77.5	77.2	78.7	79.7	79.0	78.4	78.8	79.8	79.4	78.2	78.7		80.1	79.7	79.3	78.8	79.7	79.3	78.8	79.3
ORIV BeAn17	74.5	74.4	74.7	74.8	74.2	75.7	75.5	75.8	75.0	72.1	72.7	73.0		99.5	93.1	91.3	95.2	94.3	94.3	94.8
MURV BeAn974	74.2	74.4	74.7	74.5	74.7	75.2	74.5	75.0	74.0	73.0	74.7	72.2	92.4		93.5	91.8	95.6	94.8	94.8	95.2
MTBV BeAn15	71.8	72.0	73.2	73.7	73.7	73.8	73.7	73.5	74.2	71.5	72.5	71.4	76.4	76.8		94.8	96.1	95.2	94.8	95.6
APEUV BeAn848	72.8	71.7	70.8	71.8	70.4	72.2	71.2	72.5	72.8	71.1	72.0	71.8	75.2	76.4	80.5		94.3	93.5	93.1	93.9
NFI0798	72.8	72.2	73.4	73.5	73.0	73.0	72.1	73.0	72.2	71.8	73.0	72.0	79.4	80.1	80.8	79.0		99.1	98.7	99.5
FLU3627	74.4	74.5	74.1	74.4	74.1	72.8	72.8	74.0	73.2	71.8	72.7	71.7	79.4	79.7	81.1	78.2	89.5		98.7	99.5
IQD8658	73.7	74.4	74.0	73.4	74.0	73.1	73.4	73.7	73.0	71.1	72.1	70.7	78.4	79.0	79.8	78.1	88.1	96.0		99.1
IQT9891	73.8	74.2	73.8	73.5	74.7	73.8	73.7	74.2	73.0	71.8	72.0	71.7	78.8	79.4	80.1	78.5	89.2	96.2	98.0	

Los valores en la parte inferior izquierda representan los porcentajes de identidad para nucleótidos y los valores en la parte superior derecha representan los porcentajes de identidad para aminoácidos. Los GRCV referenciales están en negrita. El porcentaje de identidad fue calculado usando 700 nucleótidos y 232 amino ácidos correspondientes parcialmente al RdRp.

6.5 Análisis antigénico

6.5.1 Microneutralización (MNT)

Los *Orthobunyavirus* del grupo C aislados en el Perú se agrupan en 4 distintos grupos (tabla 10) y están cercanamente emparentados con las secuencias filogenéticas del segmento genómico M. Los anticuerpos específicos contra CARV (HMAF-CARV), reaccionaron con títulos altos (entre 1/40 a 1/640) contra 41 aislamientos de los virus del grupo C. Todos estos 41 aislamientos tuvieron en el análisis filogenético del segmento parcial M, entre 90.2 % y 98.7 % de identidad de aminoácidos con CARV. En algunos casos estos aislamientos tuvieron cierta reacción cruzada para anticuerpos contra APEUV, MTBV o MURV, con títulos entre 1/20 ó 1/40. Por otro lado, los anticuerpos específicos contra MTBV y MURV (HMAF-MTBV y HMAF-MUR), reaccionaron con títulos altos (entre 1/160 a 1/1280) contra 17 aislamientos de los virus del grupo C, no se observó reacción cruzada para los anticuerpos contra los otros virus referenciales del grupo C. Estos 17, en el análisis filogenético del segmento parcial M, tuvieron entre 95.1 % y 95.5 % de identidad de aminoácidos con MTBV y MURV. A su vez, 5 aislamientos mostraron títulos bajos para anticuerpos contra MTBV (con títulos entre 1/20 y 1/40) y ausencia de reacción contra anticuerpos de los otros virus referenciales del grupo C. 2 aislamientos mostraron reacción con títulos altos (1/320 y 1/640) contra HMAF-ITQV. Cabe mencionar que ningún aislamiento mostro reacción contra HMAF-ORIV.

Tabla 10. Títulos de microneutralización de los virus del grupo C aislados y referenciales enfrentados contra los anticuerpos (HMAF) preparados con cepas referenciales.

Año	Virus	APEUV HMAF	CARV HMAF	ITQV PE00036 HMAF	MTBV HMAF	MURV HMAF	ORIV HMAF	Complejo formado
1995	IQT1726	NEG	1/80	NEG	NEG	NEG	NEG	CARV
1999	IQU0250	NEG	1/40	NEG	NEG	NEG	NEG	CARV
1999	IQU0540	NEG	1/320	NEG	NEG	NEG	NEG	CARV
1999	IQU1719	NEG	1/80	NEG	NEG	NEG	NEG	CARV
1999	IQU1840	NEG	1/40	NEG	NEG	NEG	NEG	CARV
1999	IQU2233	NEG	1/80	NEG	NEG	NEG	NEG	CARV
2000	IQU2992	NEG	1/40	NEG	NEG	NEG	NEG	CARV
2006	FMD0783	NEG	1/80	NEG	NEG	NEG	NEG	CARV
2006	IQE3155	NEG	1/80	NEG	NEG	NEG	NEG	CARV
2007	FMD1692	NEG	1/80	NEG	NEG	NEG	NEG	CARV
2007	FMD1729	NEG	1/40	NEG	NEG	NEG	NEG	CARV
2007	IQE5249	NEG	1/80	NEG	NEG	NEG	NEG	CARV
2007	IQE5417	NEG	1/80	NEG	NEG	NEG	NEG	CARV
2008	FMD2084	NEG	1/40	NEG	NEG	NEG	NEG	CARV
2009	FMD2329	NEG	1/80	NEG	NEG	NEG	NEG	CARV
2009	IQE9621	NEG	1/160	NEG	NEG	NEG	NEG	CARV
2010	FSL4398	NEG	1/80	NEG	NEG	NEG	NEG	CARV
2011	FPI02066	NEG	1/80	NEG	NEG	NEG	NEG	CARV
2011	FPI02188	NEG	1/80	NEG	NEG	NEG	NEG	CARV
2011	FPI02660	NEG	1/80	NEG	NEG	NEG	NEG	CARV
1999	IQU0212	1/20	1/80	NEG	NEG	NEG	NEG	CARV-APEUV
2003	IQD5973	1/20	1/80	NEG	NEG	NEG	NEG	CARV-APEUV
2004	FSL1813	1/20	1/160	NEG	NEG	NEG	NEG	CARV-APEUV
2008	FMD1899	1/20	1/80	NEG	NEG	NEG	NEG	CARV-APEUV
2012	FPI3933	1/320	1/640	NEG	NEG	NEG	NEG	CARV-APEUV
2013	FPI5338	1/320	1/640	NEG	NEG	NEG	NEG	CARV-APEUV
2000	FSL0167	1/20	1/320	NEG	1/20	NEG	NEG	CARV-APEUV-MTBV
2007	FMD1643	1/20	1/160	NEG	1/20	NEG	NEG	CARV-APEUV-MTBV
2007	FMD1684	1/40	1/160	NEG	1/20	NEG	NEG	CARV-APEUV-MTBV
2007	IQE5082	1/40	1/160	NEG	1/20	NEG	NEG	CARV-APEUV-MTBV
2008	FMD1881	1/40	1/160	NEG	1/20	NEG	NEG	CARV-APEUV-MTBV
2009	IQE8988	1/20	1/320	NEG	1/20	NEG	NEG	CARV-APEUV-MTBV
2011	FPI02530	1/40	1/160	NEG	1/20	NEG	NEG	CARV-APEUV-MTBV
2007	FMD0996	1/40	1/320	NEG	1/40	1/20	NEG	CARV-APEUV-MTBV-MURV
2011	FPI02450	1/80	1/320	NEG	1/40	1/20	NEG	CARV-APEUV-MTBV-MURV
2011	MIS1035	1/40	1/640	NEG	1/40	1/40	NEG	CARV-APEUV-MTBV-MURV
2001	FSL0512	NEG	1/160	NEG	1/20	NEG	NEG	CARV-MTBV
2003	IQD6203	NEG	1/160	NEG	1/40	NEG	NEG	CARV-MTBV
2004	FSL1270	NEG	1/320	NEG	1/40	NEG	NEG	CARV-MTBV
2011	FPI02289	NEG	1/160	NEG	1/20	NEG	NEG	CARV-MTBV
2006	FMD0845	NEG	1/320	NEG	1/40	1/20	NEG	CARV-MTBV-MURV

(Continuado)

(Continuado)

Año	Virus	APEUV HMAF	CARV HMAF	ITQV PE00036 HMAF	MTBV HMAF	MURV HMAF	ORIV HMAF	Complejo formado
2005	FSL1767	NEG	NEG	NEG	1/20	NEG	NEG	MTBV
2006	FSL2923	NEG	NEG	NEG	1/40	NEG	NEG	MTBV
2007	FMD1113	NEG	NEG	NEG	1/40	NEG	NEG	MTBV
2007	MFI0919	NEG	NEG	NEG	1/20	NEG	NEG	MTBV
2009	FSL4095	NEG	NEG	NEG	1/20	NEG	NEG	MTBV
1999	IQT9891	NEG	NEG	NEG	1/160	1/160	NEG	MTBV-MURV
1999	IQU0126	NEG	NEG	NEG	1/160	1/160	NEG	MTBV-MURV
2003	IQD5807	NEG	NEG	NEG	1/640	1/320	NEG	MTBV-MURV
2003	IQD5812	NEG	NEG	NEG	1/640	1/320	NEG	MTBV-MURV
2004	FSL1491	NEG	NEG	NEG	1/1280	1/1280	NEG	MTBV-MURV
2004	IQD8243	NEG	NEG	NEG	1/640	1/320	NEG	MTBV-MURV
2004	IQD8658	NEG	NEG	NEG	1/640	1/640	NEG	MTBV-MURV
2005	IQE1249	NEG	NEG	NEG	1/160	1/320	NEG	MTBV-MURV
2006	IQE3121	NEG	NEG	NEG	1/320	1/320	NEG	MTBV-MURV
2006	IQE4172	NEG	NEG	NEG	1/160	1/320	NEG	MTBV-MURV
2006	SER6020	NEG	NEG	NEG	1/160	1/160	NEG	MTBV-MURV
2006	FLU3627	NEG	NEG	NEG	1/320	1/320	NEG	MTBV-MURV
2008	IQE7620	NEG	NEG	NEG	1/640	1/640	NEG	MTBV-MURV
2008	IQE7743	NEG	NEG	NEG	1/640	1/640	NEG	MTBV-MURV
2008	NFI0798	NEG	NEG	NEG	1/160	1/160	NEG	MTBV-MURV
2011	FPI02026	NEG	NEG	NEG	1/320	1/160	NEG	MTBV-MURV
2011	FPI02271	NEG	NEG	NEG	1/320	1/160	NEG	MTBV-MURV
2011	FPI02607	NEG	NEG	1/640	NEG	NEG	NEG	ITQV PE00036
2007	FMD1043	NEG	NEG	1/320	NEG	NEG	1/20	ITQV PE00036-ORIV
1955	APEUV BeAn848	1/320	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	APEUV
1956	CARV BeAn3994	NEG	1/80	NEG	NEG	NEG	NEG	CARV
1996	ITQV PE00036	NEG	NEG	1/320	NEG	NEG	NEG	ITQV PE00036
1954	MTBV BeAn15	NEG	1/20	1/20	1/2560	1/160	NEG	MTBV-MURV
1955	MURV BeAn974	NEG	NEG	NEG	1/320	1/320	NEG	MTBV-MURV
1954	ORIV BeAn17	NEG	NEG	1/20	NEG	NEG	1/160	ORIV

Los valores indican títulos de neutralización. En rojo, son el grupo de aislamientos que fueron neutralizados con títulos altos por HMAF-CARV y también pertenecen al linaje 1 y 2 del clado I en la secuencia filogenética del segmento M. En marrón, el grupo de aislamientos que fueron neutralizados con títulos muy bajos con HMAF-MTBV y pertenecen al linaje 3 del clado I en la secuencia filogenética del segmento M. En verde, el grupo de aislamientos que fueron neutralizados por HMAF-MTBV y HMAF-MURV y pertenecen al clado II en la secuencia filogenética del segmento M. En azul, los aislamientos que fueron neutralizados con títulos altos por HMAF-ITQV y pertenecen al clado III en la secuencia filogenética del segmento M.

6.5.2 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

De los 65 participantes infectados con el virus del grupo C, se obtuvieron 35 muestras convalecientes (tomadas aproximadamente 2 semanas después del periodo febril-viremia) y fueron procesadas por ELISA de captura, para detectar anticuerpos reactivos de tipo IgM específicos contra el virus. En la prueba se emplearon antígenos preparados a partir de los virus referenciales del grupo C CARV BeAn3994, APEUV BeAn848, ORIV BeAn17, MTBV BeAn15, ITQV PE00036 y MURV Bean974.

La mayoría de las muestras reaccionaron contra APEUV (32/38), seguido por CARV (30/38) y 4 muestras no reaccionaron contra ningún antígeno. Teniendo en cuenta la relación ELISA y MNT podemos mencionar que, de 22 muestras convalecientes, de los aislamientos virales que reaccionaron por MNT contra HMAF-CARV, 20 muestras reaccionaron contra CARV y APEUV por ELISA, donde algunas de ellas, también dieron reacción cruzada con los otros antígenos; 2 muestras no dieron reacción contra ningún antígeno. De 11 muestras convalecientes, de los aislamientos virales que reaccionaron por MNT contra HMAF-MTBV y HMAF-MURV, 10 muestras reaccionaron contra MTBV, MURV, ORIV y APEUV por ELISA, que también dieron cierta reacción cruzada contra los otros antígenos; 1 muestra no dio reacción contra ningún antígeno. 4 muestras convalecientes, de los aislamientos virales que reaccionaron por MNT con títulos bajos contra HMAF-MTBV, también reaccionaron débilmente contra los antígenos del grupo C, 1 muestra no reaccionó contra ningún antígeno. La única muestra convaleciente, de los aislamientos virales que reaccionaron por MNT contra HMAF-ITQV PE00036, dio muy buena reacción contra el antígeno del mismo virus y contra CARV, levemente contra APEUV (tabla 11).

Los resultados del ELISA muestran cierta correspondencia con los resultados de los aislamientos sometidos a la prueba de MNT, por lo que esta prueba (ELISA) puede ser empleada para detectar casos de infecciones recientes con el virus del grupo C, pero no muy adecuada para dar resultados concluyentes.

Tabla 11. Relación de MNT y anticuerpos tipo IgM detectados por ELISA en muestras convalecientes de los pacientes aislados el virus del grupo C

Muestra	Complejo MNT *	Antígeno Viral					
		CARV BeAn3994	APEUV BeAn848	ITQV PE00036	ORIV BeAn17	MTBV BeAn15	MURV Bean974
FMD2084-C	CARV	+	++	-	-	-	+
FMD2329-C	CARV	-	-	-	-	-	-
FPI02066-C	CARV	+	-	-	-	-	-
FPI02188-C	CARV	++	++	+	-	+	+
FPI02660-C	CARV	+	+	+	-	+	-
IQE3155-C	CARV	+++	+++	++	+	++	++
IQE5249-C	CARV	+++	+++	++	+	+	+
IQU2233-C	CARV	-	+	-	-	-	-
FMD1729-C	CARV	NP**	++	-	NP**	-	NP**
FSL1813-C	CARV-APEUV	+	+	-	-	-	-
IQD5973-C	CARV-APEUV	++	+	+	-	-	+
FMD1643-C	CARV-APEUV-MTBV	+	+	-	-	-	-
FMD1881-C	CARV-APEUV-MTBV	+	++	-	-	-	+
FPI02530-C	CARV-APEUV-MTBV	++	+++	+	-	-	+
FSL0167-C	CARV-APEUV-MTBV	++	+	++	++	+++	+
IQE8988-C	CARV-APEUV-MTBV	+	++	-	-	-	-
FMD0996-C	CARV-APEUV-MTBV-MURV	++	+	++	+	++	++
FPI02450-C	CARV-APEUV-MTBV-MURV	+++	++	+	-	-	+
FPI02289-C	CARV-MTBV	+++	+++	+	+	+	+
FSL0512-C	CARV-MTBV	-	-	-	-	-	-
FSL1270-C	CARV-MTBV	++	+	-	-	+	-
IQD6203-C	CARV-MTBV	++	+	+	-	-	+
FPI02607-C	ITQV	+++	+	+++	-	-	-
FMD1113-C	MTBV	+	-	-	-	+	+
FSL1767-C	MTBV	++	++	+	+	+	++
FSL2923-C	MTBV	-	-	-	-	-	-
MFI0919-C	MTBV	-	+	-	-	-	-
FPI02026-C	MTBV-MURV	+	++	-	++	+++	++++
FPI02271-C	MTBV-MURV	+	+++	-	++	+++	++++
FSL1491-C	MTBV-MURV	-	++	-	++	+++	+++
IQD8243-C	MTBV-MURV	++	+++	+++	+++	+++	+++
IQD8658-C	MTBV-MURV	-	-	-	-	-	-
IQE1249-C	MTBV-MURV	+	+++	+	+++	++++	++++
IQE3121-C	MTBV-MURV	-	+++	-	+++	+++	+++
IQE4172-C	MTBV-MURV	++	+++	++	+++	+++	+++
IQE7620-C	MTBV-MURV	-	++++	-	++	+++	+++
IQE7743-C	MTBV-MURV	+	++++	-	++	+++	+++
NFI0798-C	MTBV-MURV	+	+++	-	+++	+++	++++

Los resultados mostrados para las muestras convalecientes, en “+” ó “-“, representan intensidad de reacción en la prueba de ELISA para cada antígeno, donde: - es negativo, + es positivo con densidad óptica entre 0.20 a 0.49, ++ es positivo con densidad óptica entre 0.50 a 0.99, +++ es positivo con densidad óptica entre 1.00 a 1.99 y ++++ es positivo con densidad óptica mayor que 2.00.

*Resultados de MNT en los aislamientos.

**No procesado

6.6 Caracterización de los virus del grupo C aislados

Las cepas referenciales CARV BeAn3994 y MADV BT4075 están emparentados en sus tres segmentos genómicos (L, M S) conformando el clado I, MURV BeAn974 y MTBV BeAn15 están emparentados en sus tres segmentos genómicos (L, M S) conformando el clado II. ITQV PE00036 está emparentado con CARV BeAn3994 y MADV BT4075 en los segmentos genómicos S y L como parte del clado I, pero en el segmento genómico M formar parte del clado III con ORIV BeAn17. APEUV BeAn848 y ORIV BeAn17 están emparentados con MURV BeAn974 y MTBV BeAn15 en los segmentos genómicos S y L como parte del clado II, pero APEUV BeAn848 en el segmento genómico M, está emparentado con CARV BeAn3994 y forman parte en el clado I.

Basadas en las características genéticas y antigénicas, los aislamientos obtenidos en las diferentes regiones del Perú pueden agruparse con las cepas referenciales. Específicamente, 41 aislamientos (30 del noreste y 11 del sureste peruano) están muy relacionados con CARV, con títulos elevados en neutralización con HMAF-CARV y con identidad en amino ácidos mayores o iguales a 96% en el segmento genómico S, mayores o iguales a 98% en el segmento genómico M y mayores o iguales a 97% en el segmento genómico L. 17 aislamientos (del noreste peruano) están muy relacionados con el complejo serológico MTBV - MURV, con títulos elevados en neutralización con MTBV o MURV y con identidad en aminoácidos mayores o iguales a 97% en el segmento genómico S, mayores o iguales a 95% en el segmento genómico M y mayores o iguales a 95% en el segmento genómico L. 2 aislamientos (noreste y sureste peruano) muy relacionados con ITQV, con títulos elevados en neutralización y con identidad en aminoácidos mayores o iguales a 96% en el segmento genómico S, mayores o iguales a 99% en el segmento genómico M y mayores o iguales a 98% en el segmento genómico L. Adicionalmente, 5 aislamientos (4 del noreste y 1 del sureste) y la cepa IQT9646 denominada Itaya (Hontz y col., 2015), están muy relacionadas CARV en los segmentos genómicos S y L, pero reaccionan inespecíficamente por neutralización con MTBV y están poco emparentados con CARV en el segmento genómico M.

Los datos obtenidos en el presente estudio confirman que los productos del segmento M, son los determinantes en la especificidad de neutralización contra los virus. Estudios anteriores en GRCV (Casals y Whitman, 1961; Shope y col., 1961; Shope y Causey, 1962) describen reacciones cruzadas basadas en los ensayos de la inhibición de la hemaglutinación y pruebas de neutralización entre CARV - APEUV, MTBV - MURV y ORIV - ITQV y basadas en los ensayos de fijación del complemento, reacción cruzada entre MURV - ORIV, ITQV - CARV y APEUV - MTBV (Shope y col., 1961; Shope y Causey, 1962). Los datos obtenidos de los análisis filogenéticos son consistentes con la afirmación de que los anticuerpos detectados por la prueba de inhibición de la hemaglutinación y la prueba de neutralización son producidos en respuesta a las glicoproteínas de superficie, codificadas por el segmento genómico M y los anticuerpos detectados por la prueba de la fijación del complemento son producidos en respuesta a las proteínas de la nucleocápside, codificadas por el segmento genómico S (Calisher, 1998).

Todos los aislamientos de GRCV descritos en el presente estudio, considerando los segmentos genómicos S y L, son agrupados en 2 clados principales, el clado I es dividido en 2 linajes, que están muy relacionados con su distribución geográfica y no con los años de los aislamientos. El linaje 1 del clado I y el clado II contienen solo GRCV aislados del noreste de la Amazonía peruana, mientras que el linaje 2 del clado I contiene principalmente GRCV aislados del sureste de la Amazonía peruana. Estos datos sugieren que hubo un ligero flujo de Orthobunyavirus dentro del Perú en los últimos 20 años.

Comparando la relación filogenética de los 3 segmentos genómicos, observamos cierta inconsistencia de los segmentos S y L en relación al segmento M en un pequeño grupo de 6 GRCVs, estos, agrupados como linaje 3 dentro del clado I en el segmento genómico M representarían un grupo de GRVs con reordenamiento genómico junto con el virus identificado como Itaya (Hontz y col., 2015). Así mismo 2 virus referenciales (APEUV y ORIV), aparentemente también podrían tener reorganización genómica, debido a que en la filogenia de los segmentos S y L, APEUV está emparentado con MURV - MTBV y en la filogenia del segmento M está emparentado con CARV - MADV, a su vez todos los aislamientos de GRCV neutralizados por HMAF-APEUV también fueron

neutralizados por HMAF-CARV. ORIV, en la filogenia de los segmentos S y L, esta emparentada con MURV – MTBV y en la filogenia del segmento M está emparentada con ITQV.

Los datos obtenidos demuestran la diversidad de GRCVs que infectan y causan enfermedades febriles en humanos en la región amazónica del Perú; así mismo sugiere que las reorganizaciones genómicas en los virus del grupo C es un fenómeno relativamente común, tal como se describen para otros Bunyavirus (Briese y col., 2013).

7. CONCLUSIONES

1. El par de *primers*; GCN6-S282-F y GCN6-S838-R, diseñados para el segmento genómico S, pueden ser empleados para detectar cualquier miembro de los virus del grupo C y también para su secuenciación y a caracterización filogenética. El par de *primers*, GCN6-M3306-F y GCN6-M4108-R, diseñados para el segmento genómico M, pueden ser empleados para el RT-PCR, secuenciación y caracterización filogenética relacionada con los complejos serológicos de los virus del grupo C y posible detección de virus con reordenamiento genético.

2. En el análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas de los segmentos genómico S y L de los virus de grupo C, se agrupan en 2 clados, donde el clado 1 está conformado por 2 linajes. En contraste, el segmento genómico M, agrupa a los virus del grupo C, en 3 clados, donde el clado 1 está conformado por 3 linajes.

3. De acuerdo al análisis filogenético del segmento M, se ha observado correlación entre este segmento genómico con la prueba de MNT.

4. El análisis filogenético de los segmentos S y L, demuestran correlación entre la distribución geográfica y diversidad genética de estos virus, siendo más conservada en la región sureste de amazonía peruana. No existe diversificación a nivel genético durante los 18 años evaluados en el estudio, tiempo transcurrido, desde el primer aislamiento hasta el último. Por otro lado, no debemos olvidar la posibilidad de que la diversidad viral esté asociada a su hospedero.

5. Basados en las características filogenéticas y antigénicas, los virus aislados pueden ser agrupados en: 41 aislamientos relacionados con CARV, 17 aislamientos relacionados con el complejo MTBV-MURV, 2 aislamientos relacionados con la cepa ITQV PE00036 y 6 aislamientos con reordenamiento genético.

8. RECOMENDACIONES

Las instituciones gubernamentales deberían promover el estudio y la búsqueda de agentes virales emergentes, con el propósito de estar preparados ante potenciales daños que puedan causar en humanos y animales.

Desarrollar estudios ecológicos para comprender mejor los vectores artrópodos y los hospederos que mantienen los virus del grupo C en el Perú.

Desarrollar nuevas técnicas que permitan detectar infecciones de los virus del grupo C en tiempo real.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AMQ, Harrach B, Harrison RL, Knowles NJ, Kropinski AM, Krupovic M, Kuhn JH, Mushegian AR, Nibert M, Sabanadzovic S, Sanfaçon H, Siddell SG, Simmonds P, Varsani A, Zerbini FM, Gorbalenya AE, Davison AJ.** Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol.* 2017 Apr 22.
- Aguilar PV, Morrison AC, Rocha C, Watts DM, Beingolea L, Suarez V, Vargas J, Cruz C, Guevara C, Montgomery JM, Tesh RB, Kochel TJ.** Guaroa virus infection among humans in Bolivia and Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 2010; 83(3): 714-721.
- Aguilar PV, Barrett AD, Saeed MF, Watts DM, Russell K, Guevara C, Ampuero JS, Suarez L, Cespedes M, Montgomery JM, Halsey ES, Kochel TJ.** Iquitos virus: a novel reassortant Orthobunyavirus associated with human illness in Peru. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5(9): e1315.
- Bishop DH.** The genetic basis for describing viruses as species. *Intervirology.* 1985; 24(2): 79-93.
- Bishop DH, Beaty BJ.** Molecular and biochemical studies of the evolution, infection and transmission of insect bunyaviruses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1988 Oct 31;321(1207):463-83
- Briese T, Alkhovsky S, Beer M, Calisher CH, Charrel R, Ebihara H, Jain R, Kuhn JH, Lambert A, Maes P, Nunes M, Plyusnin A, Schmaljohn C, Tesh RB, Yeh S-D, Elbeaino T, Digiaro M, Martelli GP, Muehlbach H-P, Mielke-Ehret N, Sasaya T, Choi IR, Haenni A-L, Jonson G, Shirako Y, Wei T, Zhou X, Junglen S.** ICTV taxonomic proposal 2016.030avM.A.v6.Bunyavirales. Create the order Bunyavirales, including eight new families, and one renamed family. 2016 <http://www.ictv.global/proposals-16/2016.030a-vM.A.v6.Bunyavirales.pdf>. Accessed 11 May 2017.

- Briese T, Calisher CH, Higgs S.** Viruses of the family Bunyaviridae: are all available isolates reassortants? *Virology*. 2013 Nov;446(1-2):207-16.
- Cabezas C, Fiestas V, García-Mendoza M, Palomino M, Mamani E, Donaires, F.** Dengue en el Perú: a un cuarto de siglo de su reemergencia. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2015;32(1):146-56.
- Calisher, CH.** Evolutionary, ecological and taxonomic relationships between arboviruses of Florida, U.S.A and Brasil. In: An overview of Arbovirology in Brasil and neighbouring countries. A.P.A. Travassos da Rosa, P.F.C. Vasconcelos & J.F.S Travassos da Rosa (eds.). Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará, 1998; p. 32-41.
- Calisher CH, Beaty BJ, Chandler LJ.** Arboviruses. in Lennette EH and Smith TF. Laboratory diagnosis of viral infections. Third Edition. EEUU: Marcel Dekker; 1999; p. 305- 332.
- Calisher, Ch.** Lifting the Impenetrable Veil: From Yellow Fever to Ebola Hemorrhagic Fever and Sars. Fort Collins, Colorado: Rockpile Press, 2013.
- Casals J, Whitman L.** Group C, a new serological group of hitherto undescribed arthropod-borne viruses. *Immunological studies. Am J Trop Med Hyg*. 1961; 10: 250-258.
- Causey OR, Causey CE, Maroja OM, Macedo DG.** The isolation of arthropod-borne viruses, including members of two hitherto undescribed serological groups, in the Amazon region of Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 1961 Mar; 10:227-49.
- Castillo Oré RM, Forshey BM, Huaman A, Villaran MV, Long KC, Kochel TJ, Guevara C, Montgomery JM, Alvarez CA, Vilcarromero S, Morrison AC, and Halsey ES.** Serologic evidence for human hantavirus infection in Peru. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. August 2012, 12(8): 683-689

- De Rodaniche E, Paes A, Galindo P.** Isolation of two antigenically distinct arthropod-borne viruses of Group C in Panama. *Am J Trop Med Hyg.* 1964, Nov;13:839-43.
- Elliott RM.** Molecular biology of the Bunyaviridae. *J Gen Virol.* 1990; 71 (Pt 3): 501-522.
- Elliott RM.** Emerging viruses: the Bunyaviridae. *Mol Med.* 1997; 3(9): 572-577.
- Elliott RM.** Orthobunyaviruses: recent genetic and structural insights. *Nat Rev Microbiol.* 2014 Oct;12(10):673-85.
- Forshey BM, Guevara C, Laguna-Torres VA, Cespedes M, Vargas J, Gianella A, Vallejo E, Madrid C, Aguayo N, Gotuzzo E, Suarez V, Morales AM, Beingolea L, Reyes N, Perez J, Negrete M, Rocha C, Morrison AC, Russell KL, Blair PJ, Olson JG, Kochel TJ;** NMRCD Febrile Surveillance Working Group. Arboviral etiologies of acute febrile illnesses in Western South America, 2000-2007. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010; 4(8): e787.
- Gubler DJ.** The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res.* 2002; 33(4): 330-342.
- Hall, T.A.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT *Nucleic Acids Symposium Series*, Vol. 41 (1999), pp. 95-98.
- Hang J, Forshey BM, Kochel TJ, Li T, Solórzano VF, Halsey ES, Kuschner RA.** Random amplification and pyrosequencing for identification of novel viral genome sequences. *J Biomol Tech.* 2012 Apr;23(1):4-10.
- Hang J, Forshey BM, Yang Y, Solórzano VF, Kuschner RA, Halsey ES, Jarman RG, Kochel TJ.** Genomic characterization of group C Orthobunyavirus reference strains and recent South American clinical isolates. *PLoS One.* 2014 Mar 14;9(3)

- Honig JE, Osborne JC, Nichol ST.** The high genetic variation of viruses of the genus Nairovirus reflects the diversity of their predominant tick hosts. *Virology*. 2004; 318(1):10-16.
- Hontz RD, Guevara C, Halsey ES, Silvas J, Santiago FW, Widen SG,** et al. Itaya virus, a Novel Orthobunyavirus Associated with Human Febrile Illness, Peru. *Emerg Infect Dis*. 2015;21: 781–788.
- INE.** *Estimaciones y Proyecciones de Población por Sexo, según Departamento, Provincia y Distrito, 2000-2015. Boletín Especial N^o 18.* 2009, Lima, Peru: Dirección Técnica de Demografía e Indicadores Sociales del Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI).
- Jonkers AH, Metselaar D, de Andrade AH, Tikasingh ES.** Restan virus, a new group C arbovirus from Trinidad and Surinam. *Am J Trop Med Hyg*. 1967 Jan;16(1):74-8.
- Junglen, S.** Evolutionary origin of pathogenic arthropod-borne viruses-a case study in the family Bunyaviridae. *Curr Opin Insect Sci*. 2016 16:81-86.
- Karabatsos, N.** *International Catalogue of Arboviruses, Including Certain Other Viruses of Vertebrates.* 3rd ed. San Antonio, Texas: American Society of Tropical Medicine and Hygiene for The Subcommittee on Information Exchange of the American Committee on Arthropod-borne Viruses, 1985.
- King M Q, Adams M J, Carstens E B, and Lefkowitz E J,** (Ed.) *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses.* Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Science; 2011.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K.** MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol*. 2016 Jul;33(7):1870-4.
- Lambert AJ, Lanciotti RS.** Molecular characterization of medically important viruses of the genus Orthobunyavirus. *J Gen Virol*. 2008; 89: 2580-2585.
- Mendez MR, Calisher CH, Kruger H, Sipan F, Sanchez S, Lazuick JS.** A continuing focus of yellow fever in the Apurimac River Valley, Ayacucho, Peru,

and the first isolation of yellow fever virus in that country. *Bull Pan Am Health Organ* 1984; 18:172–179.

Morrison AC, Forshey BM, Notyce D, Astete H, Lopez V, Rocha C, Carrion R, Carey C, Eza D, Montgomery JM, Kochel TJ. Venezuelan equine encephalitis virus in Iquitos, Peru: urban transmission of a sylvatic strain. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008; 2(12): e349.

Muranyi W, Bahr U, Zeier M, van der Woude FJ. Hantavirus infection. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Dec; 16(12):3669-79.

Nunes MR, Travassos da Rosa AP, Weaver SC, Tesh RB, Vasconcelos PF. Molecular epidemiology of group C viruses (Bunyaviridae, Orthobunyavirus) isolated in the Americas. *J Virol.* 2005; 79(16): 10561-10570.

Obijeski JF, Murphy FA. Bunyaviridae: recent biochemical developments. *J Gen Virol.* 1977; 37 (1): 1-14.

Palacios G, Tesh R, Travassos da Rosa A, Savji N, Sze W, Jain K, Serge R, Guzman H, Guevara C, Nunes MR, Nunes-Neto JP, Kochel T, Hutchison S, Vasconcelos PF, Lipkin WI. Characterization of the Candiru antigenic complex (Bunyaviridae:Phlebovirus), a highly diverse and reassorting group of viruses affecting humans in tropical America. *J Virol.* 2011; 85(8): 3811-3820.

Phillips I, Need J, Escamilla J, Colán E, Sánchez S, Rodríguez M, Vásquez L, Seminario J, Betz T, da Rosa AT. First documented outbreak of dengue in the Peruvian Amazon region. *Bull Pan Am Health Organ.* 1992; 26(3): 201-207.

Russell PK, Nisalak A, Sukhavachana P, Vivona S. A plaque reduction test for dengue virus neutralizing antibodies. *J Immunol.* 1967; 99(2): 285-290.

Sartorelli, A.C., D.S. Fischer, Downs W.G. Use of Sarcoma 180/TG to Prepare Hyperimmune Ascitic Fluid in the Mouse. *The Journal of Immunology,* 1966. 96(4): p. 676-682.

Scherer WF, Madalengoitia J, Flores W, Acosta M. The first isolations of eastern encephalitis, group C, and Guama group arboviruses from the Peruvian

Amazon region of western South America. Bull Pan Am Health Organ. 1975; 9(1): 19-26.

Schmaljohn, C. and B. Hjelle, Hantaviruses: a global disease problem. Emerg Infect Dis, 1997; 3(2): 95-104.

Shope RE, Causey CE, Causey OR. Itaquí virus, a new member of arthropod-borne Group C*. Am J Trop Med Hyg. 1961; 10: 264-265.

Shope RE, Causey OR. Further studies on the serological relationships of group C arthropod-borne viruses and the application of these relationships to rapid identification of types. Am J Trop Med Hyg. 1962; 11: 283-290.

Shope RE, Woodall JP, Travassos da Rosa A. The epidemiology of diseases caused by viruses in Groups C and Guama (Bunyaviridae). In: The Arboviruses: Epidemiology and Ecology. Volume III. Monath TP (ed.) CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, U.S. 1988; p. 37-52.

Shi X, Botting CH, Li P, Niglas M, Brennan B, Shirran SL, Szemiel AM, Elliott RM. Bunyamwera orthobunyavirus glycoprotein precursor is processed by cellular signal peptidase and signal peptide peptidase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Aug 2;113(31):8825-8830

Soldan SS, González-Scarano F. Emerging infectious diseases: the Bunyaviridae. J Neurovirol. 2005; 11(5): 412-423.

Spence L, Anderson CR, Aitken TH, Downs WG. Nepuyo virus, a new group C agent isolated in Trinidad and Brazil. I. Isolation and properties of the Trinidadian strain. Am J Trop Med Hyg. 1966 Jan;15(1):71-4.

Tesh RB, Watts DM, Russell KL, Damodaran C, Calampa C, Cabezas C, Ramirez G, Vasquez B, Hayes CG, Rossi CA, Powers AM, Hice CL, Chandler LJ, Cropp BC, Karabatsos N, Roehrig JT, Gubler DJ. Mayaro virus disease: an emerging mosquito-borne zoonosis in tropical South America. Clin Infect Dis. 1999; 28(1): 67-73.

- Tikasingh, E.S., L. Spence, Downs W.G.** The Use of Adjuvant and Sarcoma 180 Cells in the Production of Mouse Hyperimmune Ascitic Fluids to Arboviruses. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1966. 15(2): p. 219-226.
- Treangen TJ, Schoeler G, Phillippy AM, Bergman NH, Turell MJ.** Identification and Genomic Analysis of a Novel Group C Orthobunyavirus Isolated from a Mosquito Captured near Iquitos, Peru. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Apr 13;10(4)
- Turell MJ, O'Guinn ML, Jones JW, Sardelis MR, Dohm DJ, Watts DM, Fernandez R, Travassos da Rosa A, Guzman H, Tesh R, Rossi CA, Ludwig V, Mangiafico JA, Kondig J, Wasieloski LP Jr, Pecor J, Zyzak M, Schoeler G, Mores CN, Calampa C, Lee JS, Klein TA.** Isolation of viruses from mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected in the Amazon Basin region of Peru. *J Med Entomol*. 2005 Sep;42(5):891-8
- Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa APA, Pinheiro FP, Shope RE, Travassos da Rosa JFS, Rodrigues SG, Dégallier N, Travassos da Rosa ES.** Arboviruses pathogenic for man in Brazil. In: Travassos da Rosa APA, Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa JFS (ed.) *An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries*. 1998. Belem: Instituto Evandro Chagas, pp 72-99
- Walter CT, Barr JN.** Recent advances in the molecular and cellular biology of bunyaviruses. *J Gen Virol*. 2011; 92: 2467-84.
- Watts DM, Callahan J, Rossi C, Oberste MS, Roehrig JT, Wooster MT, Smith JF, Cropp CB, Gentrau EM, Karabatsos N, Gübler D, Hayes CG.** Venezuelan equine encephalitis febrile cases among humans in the Peruvian Amazon River region. *Am J Trop Med Hyg*. 1998; 58(1): 35-40.
- Watts DM, Lavera V, Callahan J, Rossi C, Oberste MS, Roehrig JT, Cropp CB, Karabatsos N, Smith JF, Gubler DJ, Wooster MT, Nelson WM, Hayes CG.** Venezuelan equine encephalitis and Oropouche virus infections among Peruvian army troops in the Amazon region of Peru. *Am J Trop Med Hyg*. 1997a; 56(6): 661-667.

Watts DM, Phillips I, Callahan JD, Griebenow W, Hyams KC, Hayes CG.

Oropouche virus transmission in the Amazon River basin of Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 1997b; 56(2): 148-152.

Weaver SC, Reisen WK. Present and future arboviral threats. *Antiviral Res.* 2010;

85(2): 328.

Woodall, JP. Transmission of group C arboviruses (Bunyaviridae), in Arctic and

Tropical Arboviruses. Kurstak, E. (Ed.), Academic Press, New York, 1979, pp 123-138.

10. ANEXOS

Medio de mantenimiento para cultivo celular:

- E-MEM
- Suero bovino fetal ----- 2%
- Aminoácidos no esenciales ----- 1%
- Piruvato de sodio ----- 1%
- Antibiótico antimicótico ----- 1%

Buffer fosfato salino (PBS)

- NaCl ----- 8.00 g/L
- KCl ----- 0.20 g/L
- Na₂HPO₄ ----- 1.42 g/L
- KH₂PO₄ ----- 0.24 g/L

Buffer Tris Borato EDTA (TBE)

- Tris base ----- 89 mM
- EDTA ----- 2 mM
- Ácido bórico ----- 80 mM

Buffer de limpieza para secuenciación

- Acetato de sodio 3M, pH 5.4 ----- 3 μ L
- Etanol absoluto ----- 62,5 μ L
- Agua destilada ----- 14.5 μ L

Colorante para neutralización

- Naphthol blue-black ----- 1.0 g
- Acetato de sodio ----- 13.6 g
- Ácido acético glacial ----- 60 mL
- Agua Destilada ----- 940 mL

Buffer para ELISA, pH 7.4

- Leche descremada ----- 5 %
- Tween 20 ----- 0.1 %
- Diluidos en PBS

Buffer de lavado para ELISA

- Tween 20 ----- 0.1 %
- Diluido en PBS

11. PRODUCTIVIDAD CIENTÍFICA

Castillo Oré RM, Caceda RE, Huaman AA, Williams M, Hang J, Juarez DE, Kochel TJ, Halsey ES, Forshey BM. Molecular and antigenic characterization of group C orthobunyaviruses isolated in Peru. PLoS One. 2018 Jul 19;13(7): e0200576. doi: 10.1371/journal.pone.0200576. eCollection 2018. PubMed PMID: 30024910; PubMed Central PMCID: PMC6053143.