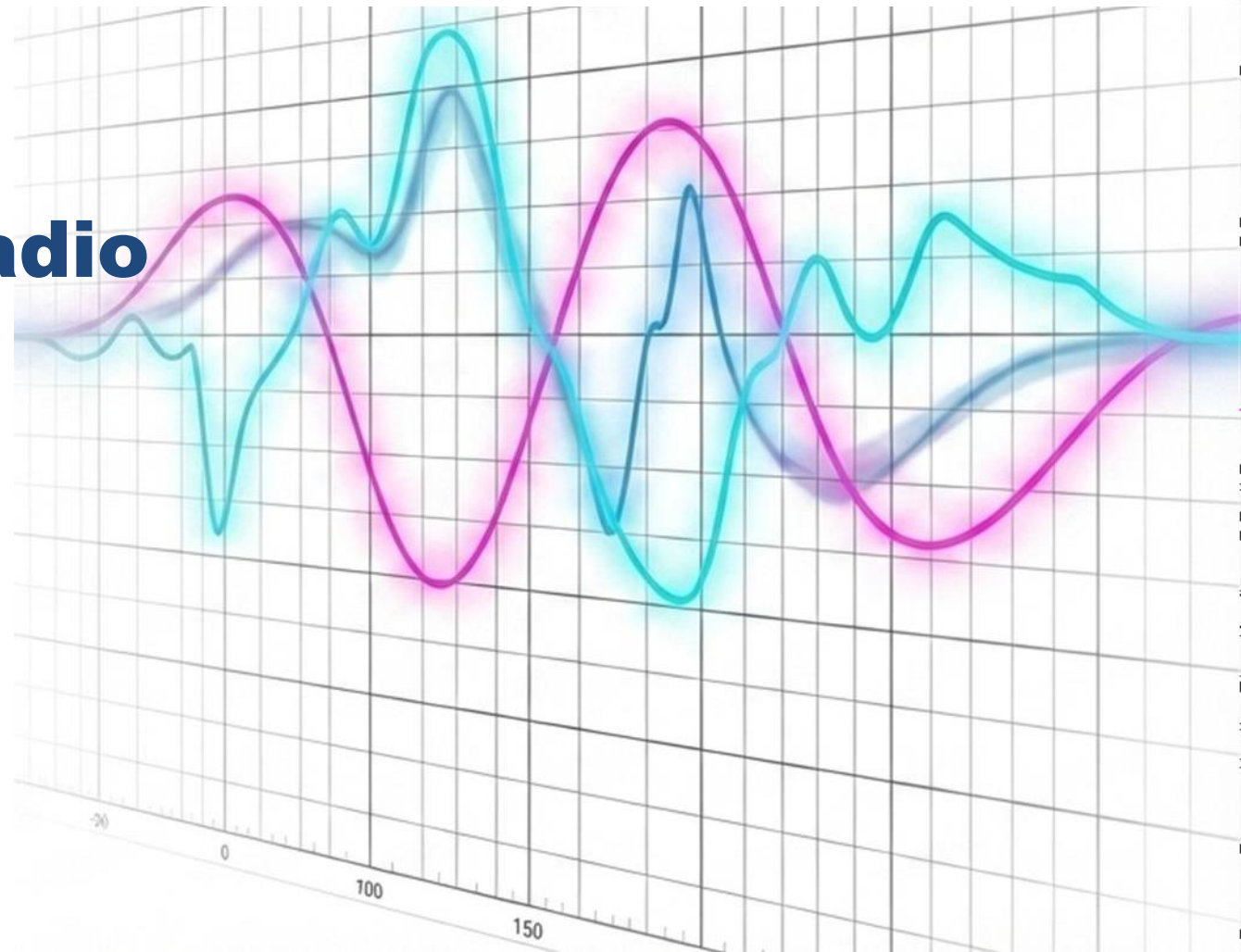


VII Jornadas Actualización en Inmunizaciones 2026

XX Aniversario Curso Latinoamericano Actualización en Inmunizaciones a Distancia

Dengue: métodos diagnósticos según estadio de la enfermedad y antecedentes de vacunación

Bioq. Cristina Alvarez López
Laboratorio de Virología – División Laboratorio Central




390 Millones

de infecciones anuales a nivel global.

96 millones con manifestaciones clínicas agudas.

El virus transmitido por mosquitos de **más rápida propagación** a nivel mundial.

Huella epidemiológica: Una endemia impulsada por factores antropogénicos



Endémico en **100-128 países**
(Zonas tropicales y subtropicales).
Asia soporta el **70%** de la carga global.



Urbanización:
Crecimiento
descontrolado.



Población:
Aumento de
densidad.



Clima:
Calentamiento global
alterando hábitats.



Viajes:
Movilidad
internacional acelerada.

Virus Dengue

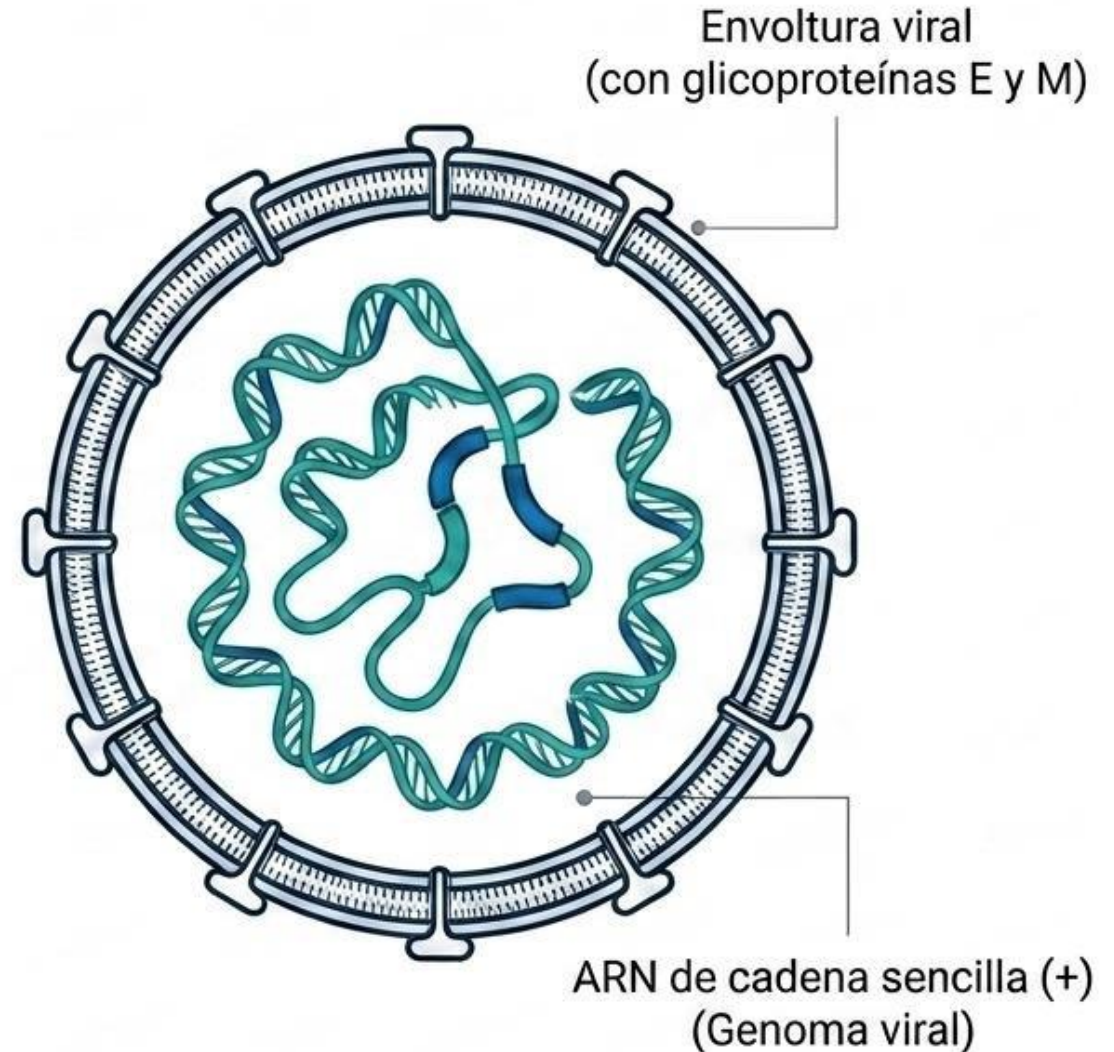
Familia: Flaviviridae

Género: Orthoflavivirus

Naturaleza: ARN de cadena sencilla y sentido positivo.

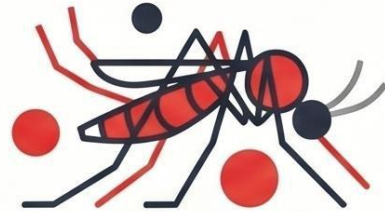
4 serotipos principales
(DENV-1 a DENV-4).

Homología: Comparten entre 65% y 70% de su genoma.



Aedes aegypti vs. *Aedes albopictus*: Los Rostros del Dengue

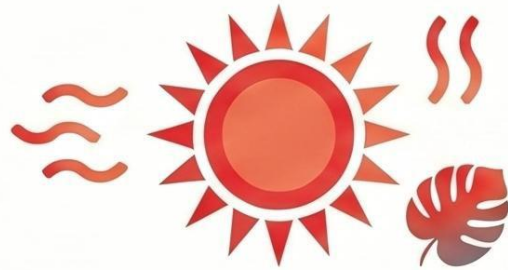
AEDES AEGYPTI: MOTOR DE EPIDEMIAS URBANAS



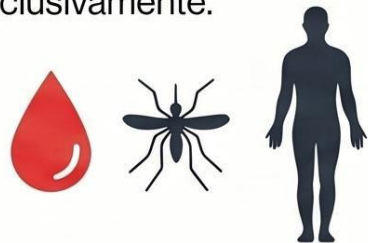
EFICIENCIA: VECTOR PRINCIPAL
Más eficiente replicando el virus.



CLIMA: CALOR TROPICAL
Habita zonas tropicales.



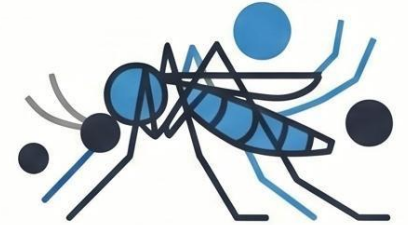
DIETA: HUMANO-DEPENDIENTE
Busca sangre humana casi exclusivamente.



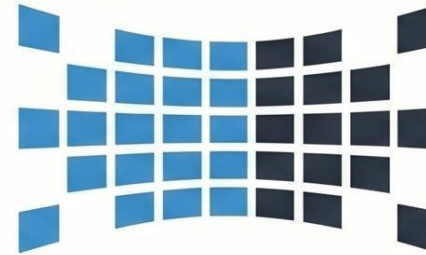
HÁBITAT: ENTORNO URBANO
Vive dentro de las casas.



AEDES ALBOPICTUS: AMENAZA DE EXPANSIÓN GEOGRÁFICA



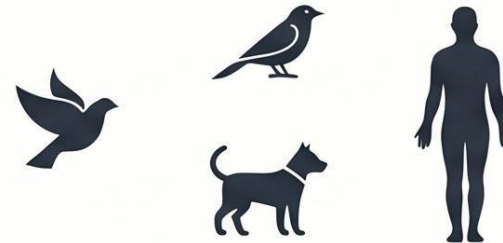
EFICIENCIA: VECTOR SECUNDARIO
Destaca por su rápida expansión.



CLIMA: ADAPTACIÓN TEMPLADA
Resiste el frío; coloniza Europa y Norteamérica.



DIETA: ALIMENTACIÓN GENERALISTA
Pica también a animales y aves.

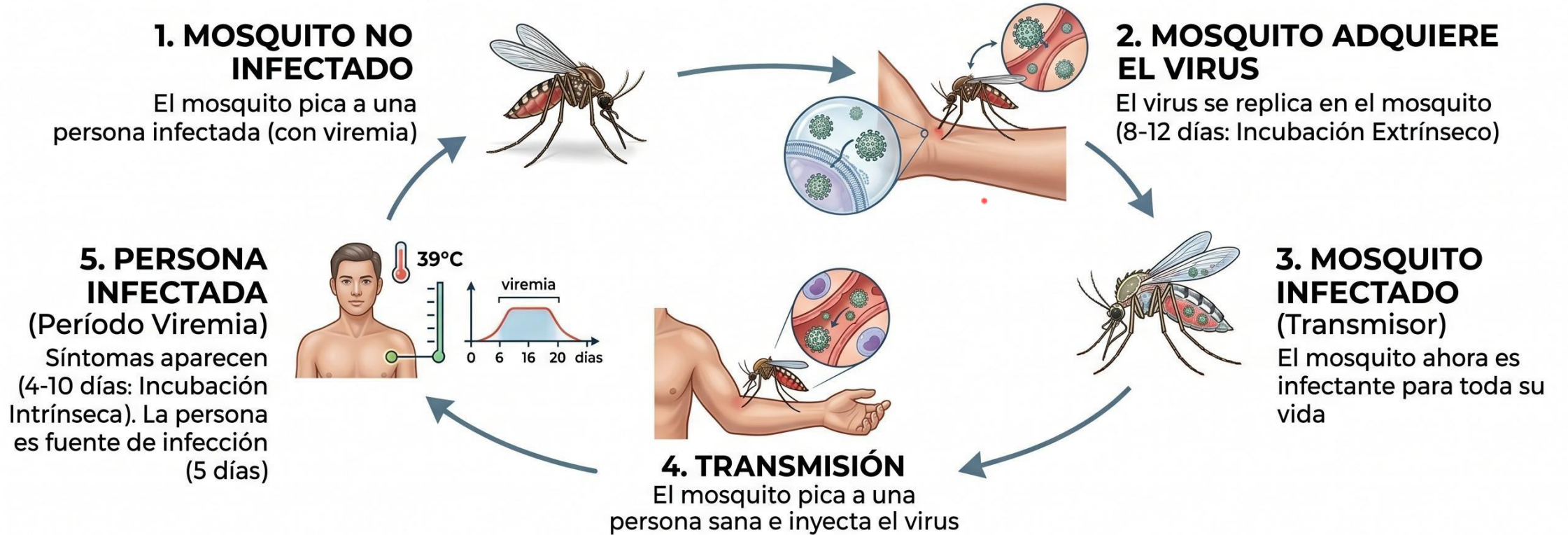
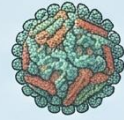


HÁBITAT: ÁREAS RURALES
Sobrevive en zonas rurales y boscosas.

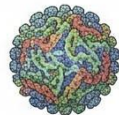




CICLO DE TRANSMISIÓN DEL VIRUS DENGUE



COMPONENTES CLAVE



1. Virus Dengue
Serotipos 1, 2, 3, 4



2. Mosquito Vector
Aedes aegypti



3. Huésped Humano
Sano e Infectado

PREVENCIÓN Y CONTROL



ELIMINAR CRIADEROS
Vaciar recipientes

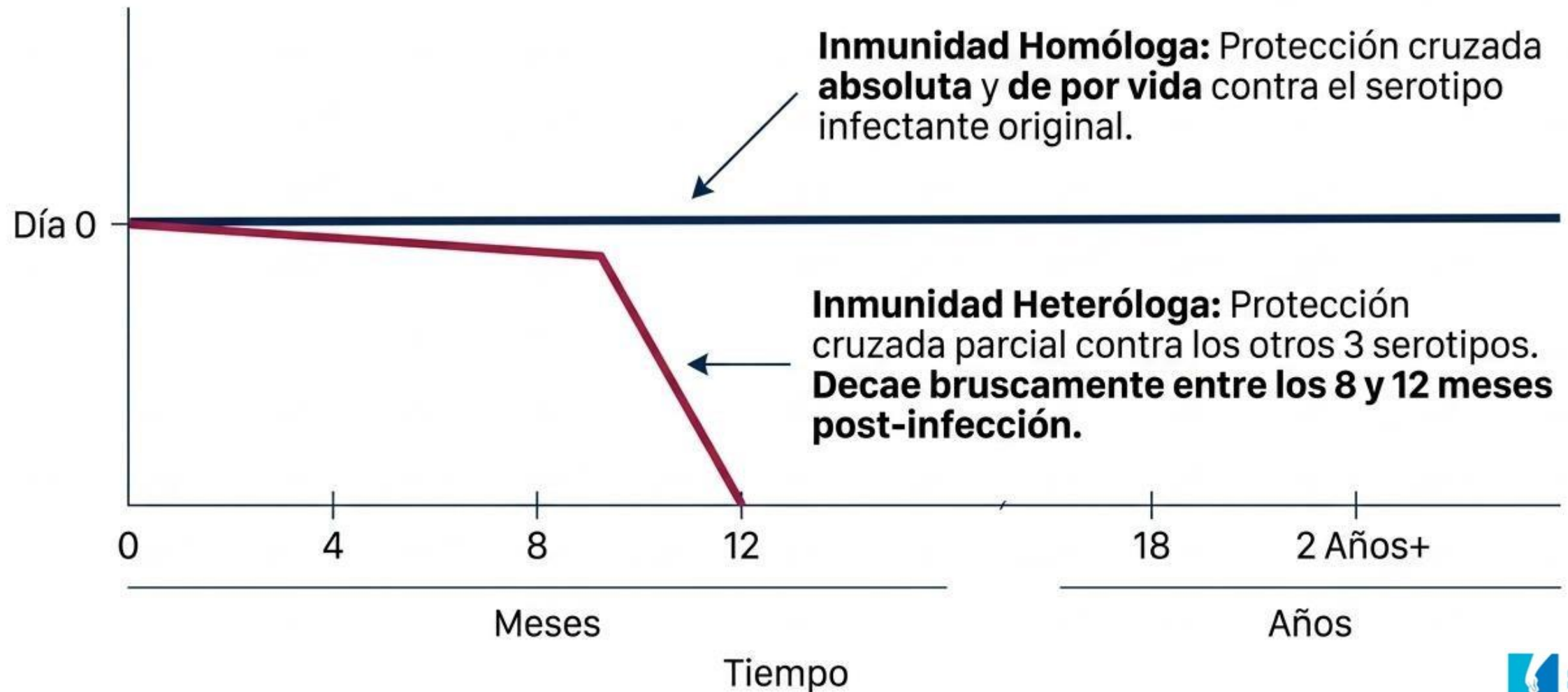


USAR REPELENTE
(Spray/Ropa)

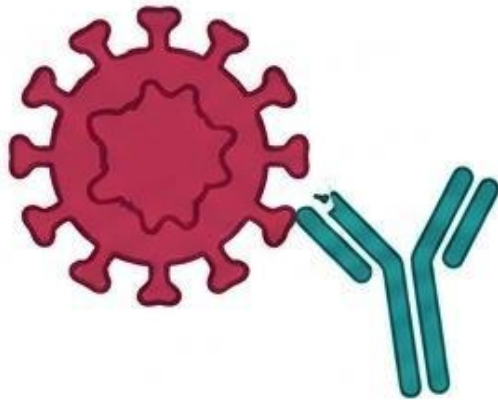


INSTALAR MOSQUITEROS
(Ventanas)

La paradoja inmunológica: Protección permanente vs. transitoria

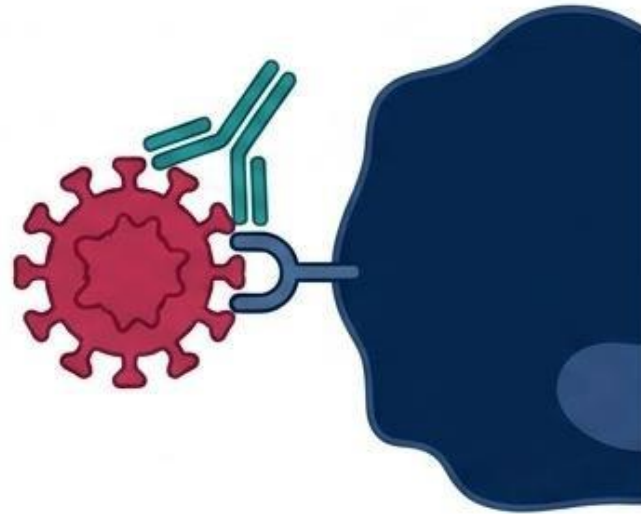


Potenciación Dependiente de Anticuerpos (ADE): El motor de la gravedad clínica



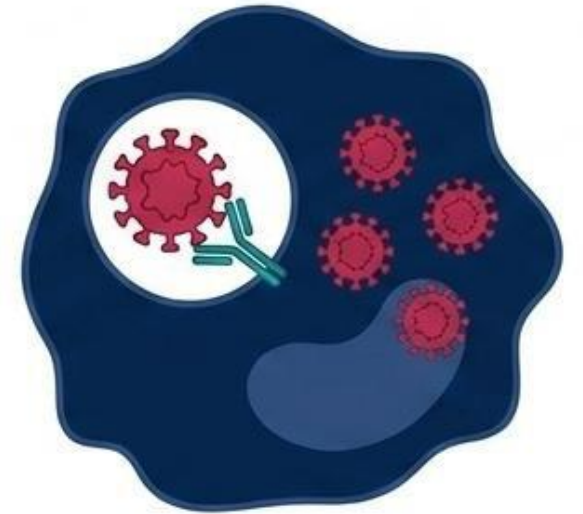
Encuentro Imperfecto:

Infección secundaria por un serotipo distinto. Anticuerpos heterólogos preexistentes se unen al virus sin neutralizarlo.



El Caballo de Troya:

El complejo Virus-Anticuerpo se acopla a los receptores Fc de los macrófagos.



Replicación Exacerbada:

Facilitación de entrada celular, desencadenando viremia masiva y alto riesgo de choque o fiebre hemorrágica.

La arquitectura genómica de ~11 kb dicta la patogenicidad y el diagnóstico

Proteínas Estructurales
(Forman la partícula viral): **C, prM, E.**

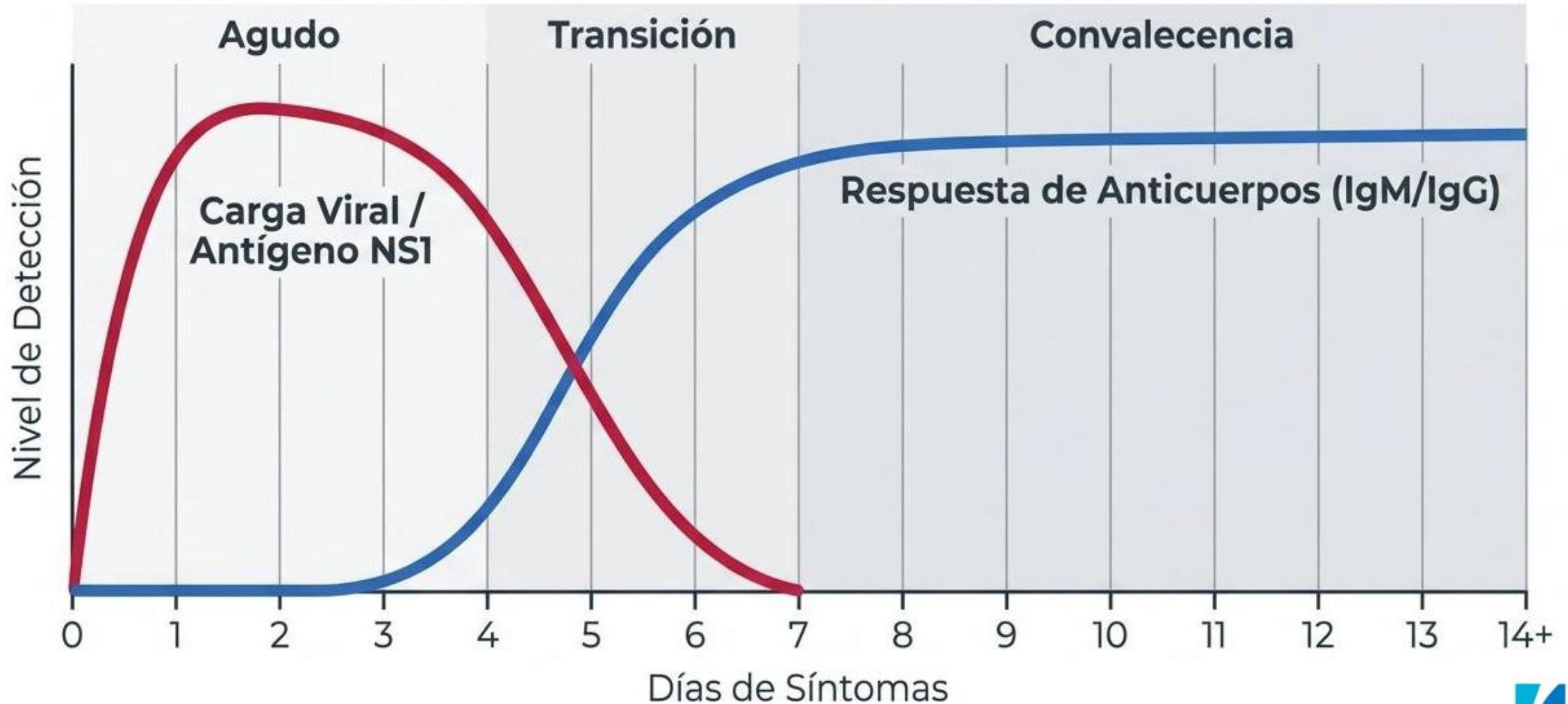
Proteínas No Estructurales (Replicación y evasión inmune): **NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5.**



NS1: Biomarcador clave para el diagnóstico clínico temprano.

Dinámica Fisiopatológica: Carga Viral vs. Respuesta Inmune

La estrategia diagnóstica debe transformarse a medida que la viremia desciende y los anticuerpos neutralizantes aumentan.



Días 0 a 7: Buscar el Virus, No la Respuesta

Durante el estadio agudo o fase virémica, el objetivo exclusivo es la detección directa de componentes virales en sangre.



NAAT / RT-PCR



Método de elección.



Alta especificidad y capacidad para identificar el serotipo infectante.



Ventana ideal: Primeros 5 a 7 días.

Antígeno NS1



Proteína viral secretada abundantemente desde el día 1 de fiebre.



Sensibilidad equivalente a la PCR durante los primeros 7 días (hasta el día 9 en primarias).

El Aislamiento Viral: Estándar de Oro, pero no de Rutina

Aunque el aislamiento viral se considera el estándar de oro para la identificación directa del dengue, su rol en la práctica clínica diaria es nulo.



Requiere infraestructura de laboratorio compleja.

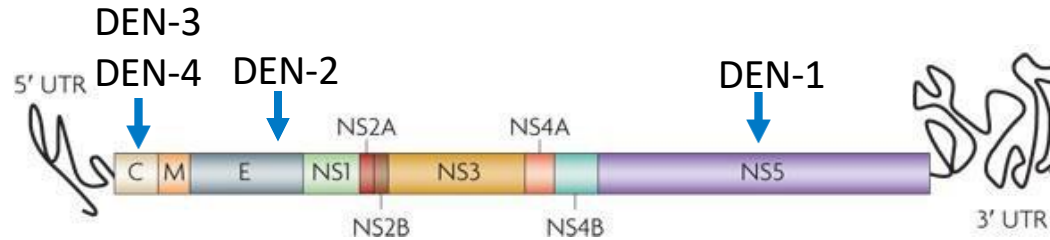


Exige personal altamente capacitado.



Su uso está restringido exclusivamente a fines de vigilancia epidemiológica y no a la toma de decisiones clínicas inmediatas.

Estrategia diagnóstica por RT-qPCR en HNRG



1. Screening: Trioplex ZCD

- Detección conjunta de Zika-Chik-Dengue
- No identifica serotipo Dengue
- Alta S (útil frente a NS1 neg)
- Herramienta útil para vigilancia

2. Tipificación: CDC

- Prueba IVD
- Formato multiplex
- Probes: FAM (DV1, RP), HEX (DV2), TEXAS RED (DV3), CY5 (DV4)

La transición a Trioplex quintuplicó la capacidad de vigilancia de arbovirus frente al aumento de ETMO



Vigilancia Tradicional

- qRT-PCR singleplex (ZIKA y CHIKV)
- Algoritmo de tipo secuencial

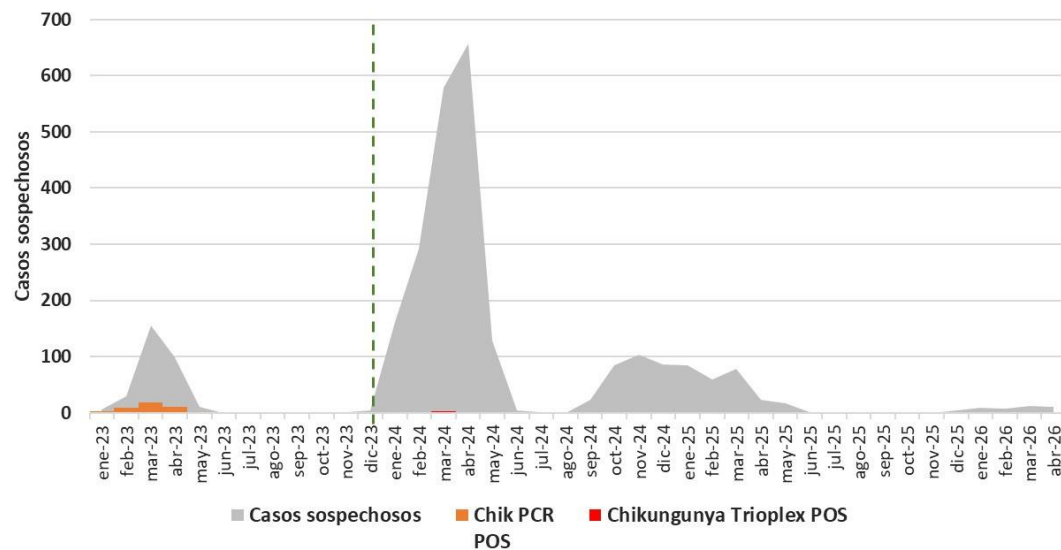
Aumento progresivo de ETMO

qRT-PCR Trioplex ZCD

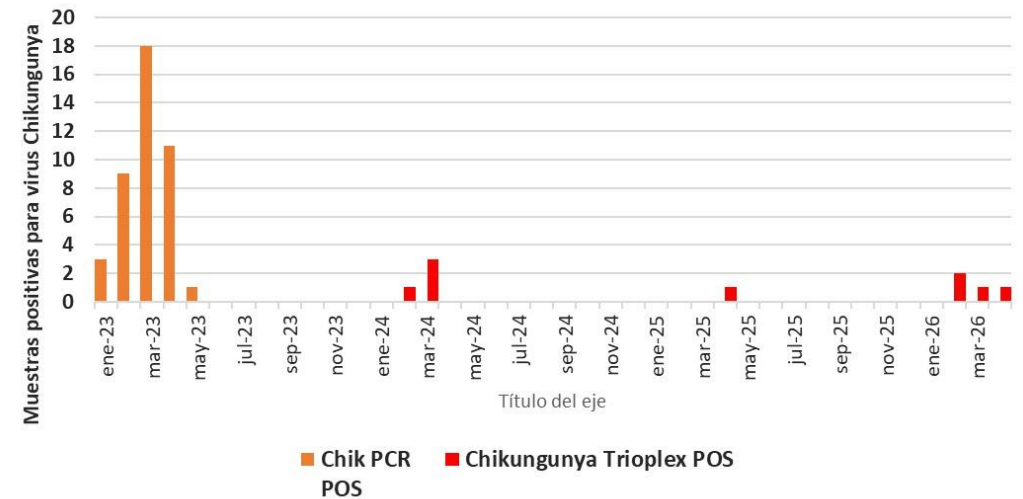
- Testeo conjunto
- Alta sensibilidad y costo-efectiva
- Vigilancia más amplia y oportuna



Muestras detectables/estudiadas para Chikungunya 2023-2026

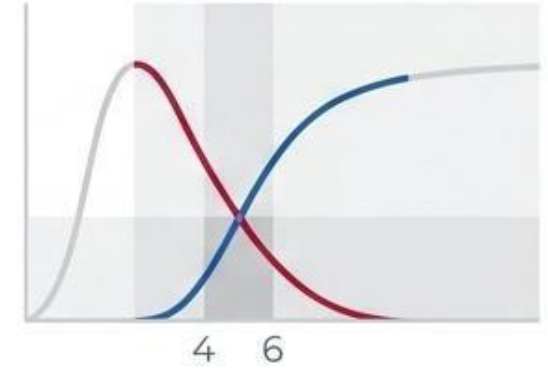


Detección de Virus Chikungunya Periodo 2023 a 2026



Días 4 a 6: La Estrategia Dual en la Ventana de Transición

Un periodo crítico y engañoso. La viremia desciende rápidamente hacia niveles indetectables, mientras que los anticuerpos apenas comienzan a cruzar el umbral de detección.



**Caída de
Carga Viral**



**Aparición de
Anticuerpos**

Recomendación CDC:

Implementar combinaciones de pruebas directas e indirectas para compensar la caída de carga viral.

Protocolos sugeridos: PCR + IgM o NSI + IgM.

Día >7: El Diagnóstico Depende de la Memoria Serológica

En el estadio de convalecencia, los métodos directos pierden toda sensibilidad. El diagnóstico recae exclusivamente en la serología.

IgM (Prueba Primaria)

Aparecen entre los días 3 y 5, alcanzan su pico a las 2 semanas y persisten por aproximadamente 3 meses.



**Persistencia
de IgM**

IgG (Confirmación)

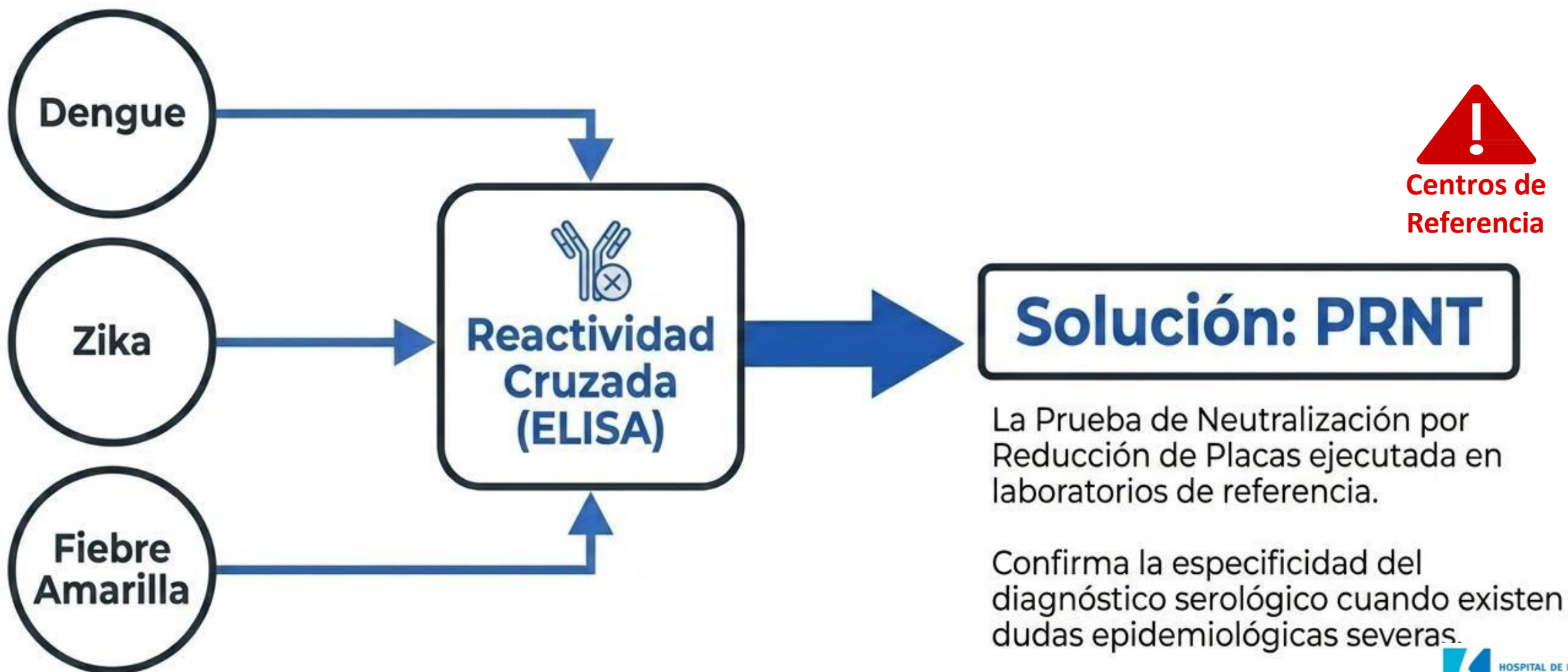
Una sola muestra de IgG en fase aguda no tiene valor. Requiere un par serológico (muestras separadas por 10-14 días) para demostrar un aumento de 4 veces en los títulos.



Mes 3

El Reto de la Reactividad Cruzada en Zonas Endémicas

Los anticuerpos contra el dengue pueden generar falsos positivos con otros flavivirus circulantes.




Centros de Referencia

Solución: PRNT

La Prueba de Neutralización por Reducción de Placas ejecutada en laboratorios de referencia.

Confirma la especificidad del diagnóstico serológico cuando existen dudas epidemiológicas severas.

Caso Clínico: Síndrome Febril Agudo y la Trampa Serológica

Perfil Clínico

Paciente:

Femenina, 35 años. Procedente de un área vulnerable de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA). Sin antecedentes recientes de viaje.

Presentación:

Evolución de 4 días con fiebre, cefalea, dolor retroocular, mialgias, artralgias, náuseas y vómitos.

Sospecha Epidemiológica:

Infección por Virus Dengue (DENV).

Matriz de Evolución Diagnóstica

Parámetro Analítico	Día 3 (15/01/10): Fase Aguda	Día 16 (28/01/10): Convaleciente
Ag NS1 (DENV)	Negativo	No Realizado
RT-PCR (DENV)	Negativo	No Realizado
IgM (DENV)	Negativo	Positivo*
IgG (DENV)	Negativo	Positivo*

*Análisis: La aparente seroconversión tardía para DENV resulta incongruente con la ausencia de antígeno NS1 y ARN viral en la fase aguda temprana.

Resolución Diagnóstica: Arbovirus Cocirculantes y Reactividad Cruzada

Diagnóstico Definitivo: Virus de la Encefalitis de San Luis (SLEV)

Fase Aguda (Día 3)

- **RT-PCR Duplex:** Detectable para Flavivirus; positiva para **SLEV**.
- **Secuenciación Genética:** Amplificación del gen NS5. Confirmación de **Genotipo III** (96-100% de identidad con la cepa endémica CbaARG-05).

Fase Convaleciente (Día 16)

- **Ensayo de Neutralización (PRNT):** Confirmó la seroconversión específica para **SLEV**.
- **Diagnóstico Diferencial:** Se descartó la infección por **DENV** y Virus del Nilo Occidental (**WNV**).

El Imperativo Clínico



La Trampa Diagnóstica (Serología)

Mecanismo: Alta homología antigénica estructural entre los miembros de la familia Flaviviridae (complejo SLEV, DENV, WNV, Zika).

Consecuencia: Las pruebas serológicas rápidas (ELISA captura IgM/IgG) producen falsos positivos debido a la reactividad cruzada, enmascarando brotes silenciosos de arbovirus menos prevalentes.



El Estándar de Referencia (Diagnóstico Molecular)

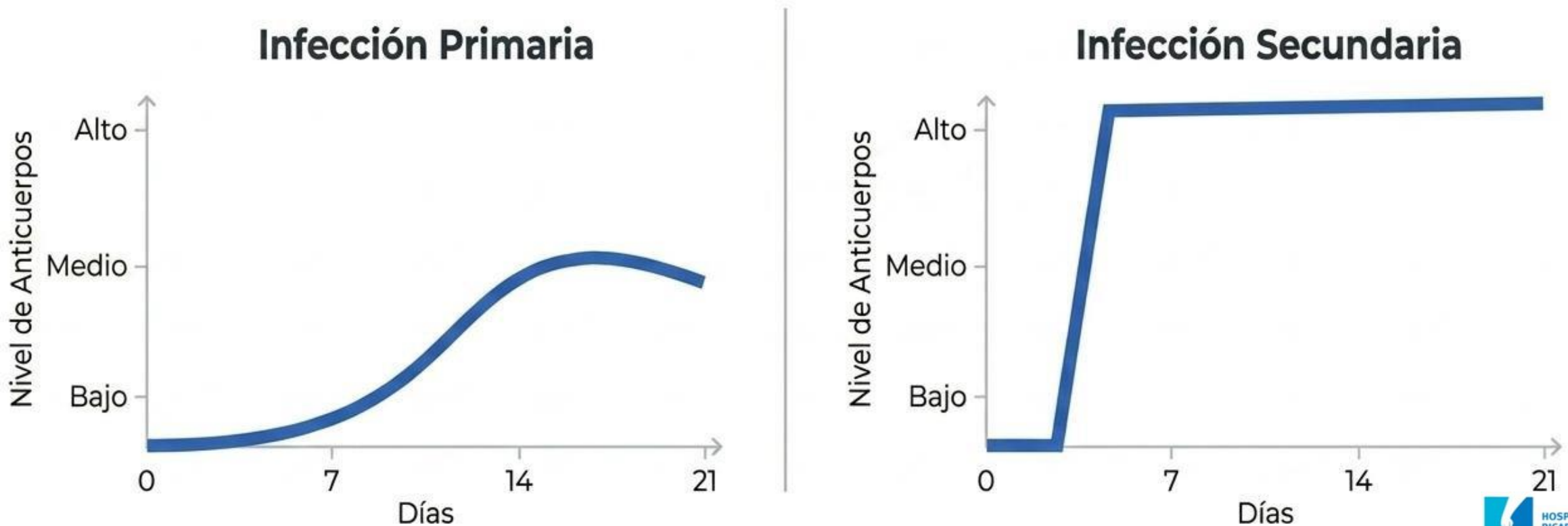
Estrategia Aguda: Detección directa de ARN viral mediante **RT-PCR y secuenciación** en suero (o LCR ante compromiso neurológico) durante la fase virémica temprana (<5 días).

Estrategia Convaleciente: Ante resultados serológicos positivos, la confirmación absoluta requiere ensayos laboriosos pero específicos como la Neutralización por Reducción de Placas (**PRNT**).

Las Infecciones Secundarias Alteran las Reglas Base

La memoria inmunológica de una infección previa por un serotipo diferente cambia radicalmente la cinética de la respuesta del paciente.

Genera un aumento explosivo y temprano de IgG (detectable desde el día 4), mientras que la respuesta de IgM se suprime, volviéndose muy baja o indetectable.

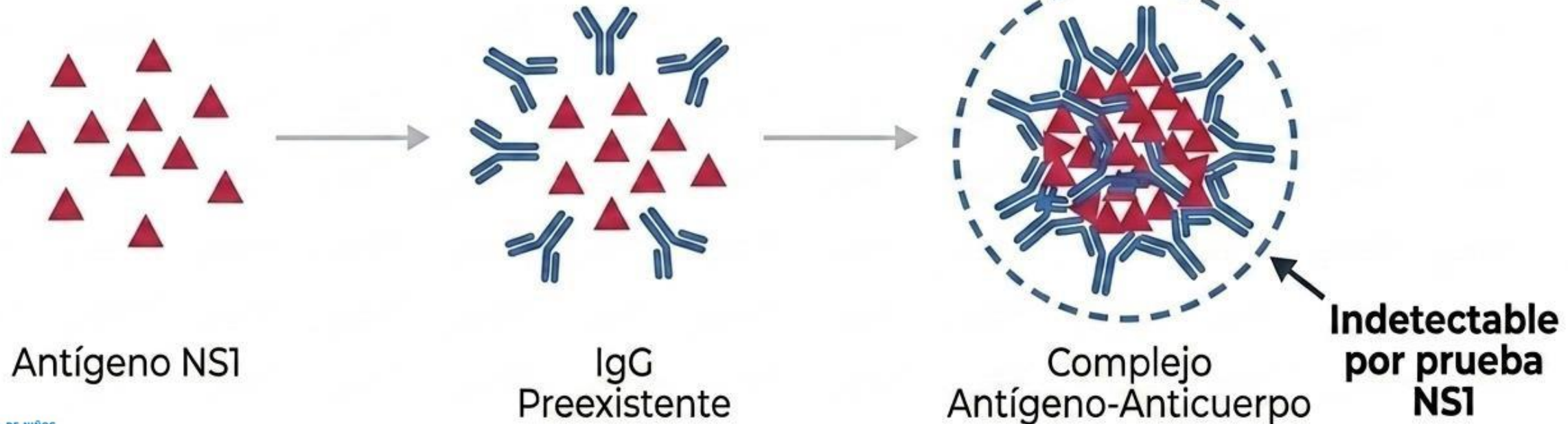


NSI en infecciones secundarias

Mecanismo: En una infección secundaria, la abundante IgG preexistente se une inmediatamente al antígeno NSI recién secretado.

Efecto: Se forman complejos antígeno-anticuerpo masivos que las pruebas estándar no pueden detectar.

Impacto Clínico: La **ventana de sensibilidad** de la prueba NSI se desploma dramáticamente de 7-9 días a apenas 1 a 4 días.



Matriz Diagnóstica: Infección Primaria vs. Secundaria

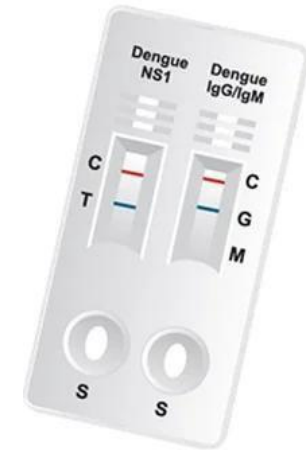
Parámetro	Infección Primaria	Infección Secundaria
Persistencia ARN/NS1	Larga (Hasta 7-9 días)	Corta (Se oculto por IgG)
Ventana Sensibilidad NS1	1 a 7 (o 9) días	Apenas 1 a 4 días
Cinética IgM	Primaria, respuesta fuerte	Suprimida, baja o indetectable
Cinética IgG	Lenta, tardía	Explosiva, detectable desde Día 4

Algoritmo de Decisión Clínica

Días de Síntomas	Prueba Primaria	Prueba Secundaria (Complemento)	Alerta Clínica
Días 0-3	PCR o NSI	No aplica serología	Sensibilidad máxima. En infección secundaria, NSI solo sirve en esta ventana.
Días 4-6	PCR o NSI	+ IgM	Riesgo alto de falsos negativos. Ordenar estrategia dual obligatoria.
Día >7	IgM	IgG (Par serológico a 10-14 días)	Métodos directos (PCR/NSI) inútiles. Riesgo de reactividad cruzada (requiere PRNT si hay duda).

Test rápido (TR)

- Inmunoensayo cromatográfico de flujo lateral con interpretación óptica
- Para utilizar en laboratorios de baja complejidad
- Detecta NS1 – IgM – IgG
- Sensibilidad y Especificidad variables
- VPP y VPN variables (en relación con prevalencia)
- No recomendado para períodos inter epidémicos



			Interpretación
NS1 +	IgM -	IgG -	PROBABLE
NS1 +	IgM -	IgG +	PROBABLE
NS1 +	IgM +	IgG -	PROBABLE
NS1 +	IgM +	IgG +	PROBABLE
NS1 -	IgM +	IgG +	PROBABLE
NS1 -	IgM +	IgG -	PROBABLE

Utilización en situación de brote

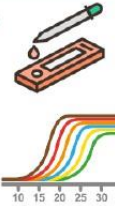


Evaluación del desempeño del TR de Antígeno NS1 para virus Dengue en HNRG 2024

MATERIALES Y MÉTODOS



Análisis retrospectivo de resultados de TR para DENV y RT-qPCR de **358 pacientes** con sospecha de infección aguda por DENV que concurren al hospital en un período de cuatro meses.



Se utilizó el **TR JusChek®**, realizado de acuerdo a las indicaciones del fabricante.
La detección molecular de DENV se realizó mediante **RT-qPCR** de acuerdo al protocolo CDC.

CONCLUSIONES

El análisis de concordancia entre el método molecular y el TR evidenció un **buen desempeño del TR**, pero mostró una S menor a la reportada por el fabricante (95.8%).

Se observaron **diferentes desempeños del TR para DENV1 y DENV2**, lo que hace necesario interpretar los resultados del TR de acuerdo al escenario particular de cada brote y de los serotipos circulantes.

El **bajo VPN del TR** indica que frente a resultados negativos no es correcto descartar un caso sospechoso de DENV y que pueden requerirse estudios adicionales.

RESULTADOS

Tabla n°1: Resultados obtenidos para TR Juschek y RT-qPCR.

		RT-qPCR		
		Detectable	No detectable	Total
Test Rápido	Positivos	206	9	215
	Negativos	47	96	143
	Total	253	105	358

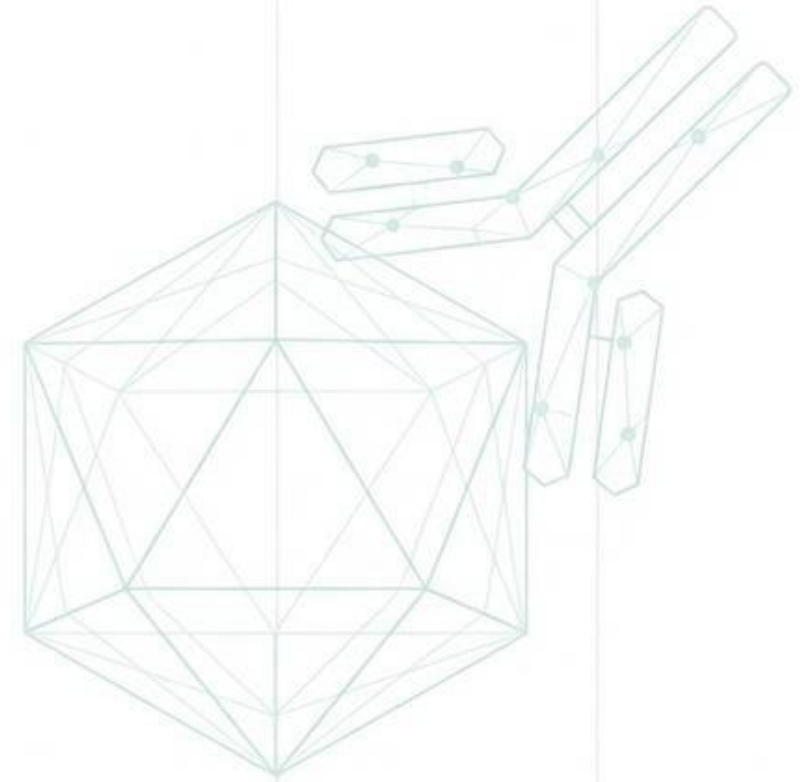
Sensibilidad: 81.4%
(IC: 76.2-85.7%)
Especificidad: 91.4%
(IC: 84.5-95.4%)
Valor predictivo negativo: 67.1%
Valor predictivo positivo: 95.8%

Tabla n°2: Sensibilidad para TR de acuerdo con los diferentes serotipos DENV.

		Serotipo	
		DENV-1	DENV-2
Detectables por RT-qPCR		108	117
Test Rápido	Positivos	106	100
	Negativos	2	17
Sensibilidad (%) IC (95%)		98.1 (93.5-99.5)	85.5 (77.9-90.7)

Interferencia Vacunal en el Diagnóstico del Dengue

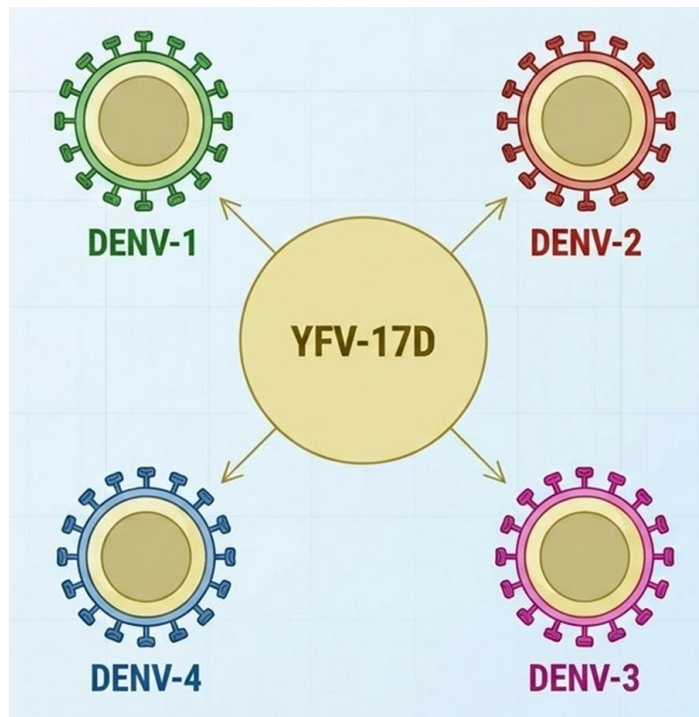
Impacto de la vacuna TAK-003 (Qdenga) y actualización del algoritmo clínico.



Vacunas Dengue: Tres diseños

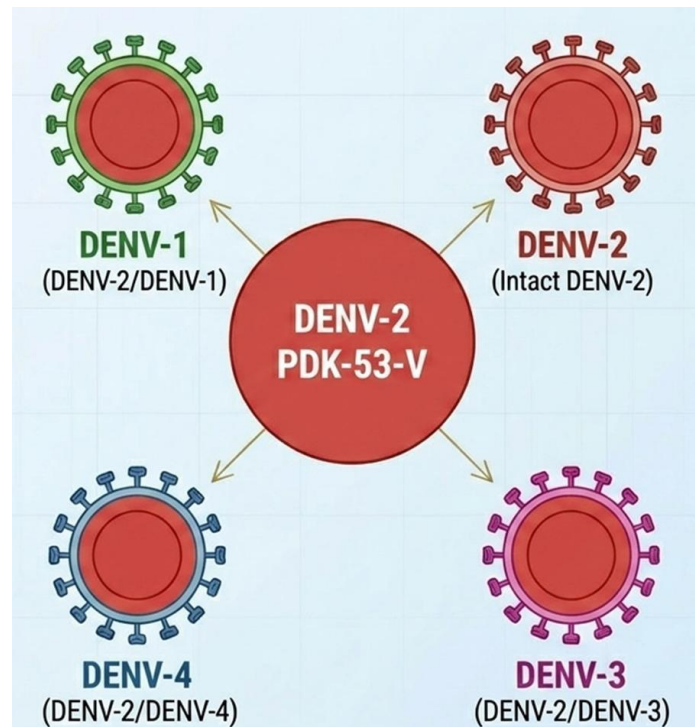
Comparativa de vacunas vivas atenuadas tetravalentes

Arquitectura 1: **Dengvaxia**



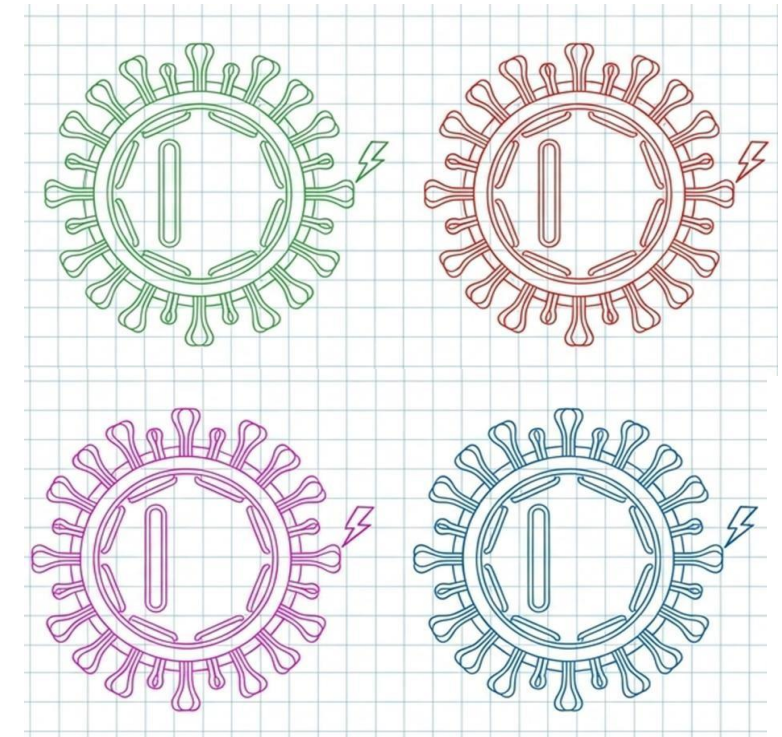
Quimera YFV/DENV

Arquitectura 2: **TAK-003**



Quimera DENV2/DENV (1,3,4)

Arquitectura 3: **TV 003/TV 005**



Genomas completos con delección $\Delta 30$

La protección inmunológica de TAK-003 introduce un punto ciego en el laboratorio.



El Avance

La vacuna viva atenuada TAK-003 (Qdenga) proporciona respuesta inmunológica y protección contra la infección por dengue.

El Desafío

Las pruebas inmunológicas tradicionales pierden capacidad predictiva, siendo incapaces de distinguir entre la respuesta a la vacuna y una infección natural por virus salvaje.

La serología temprana pierde utilidad clínica por el mimetismo inmunológico.

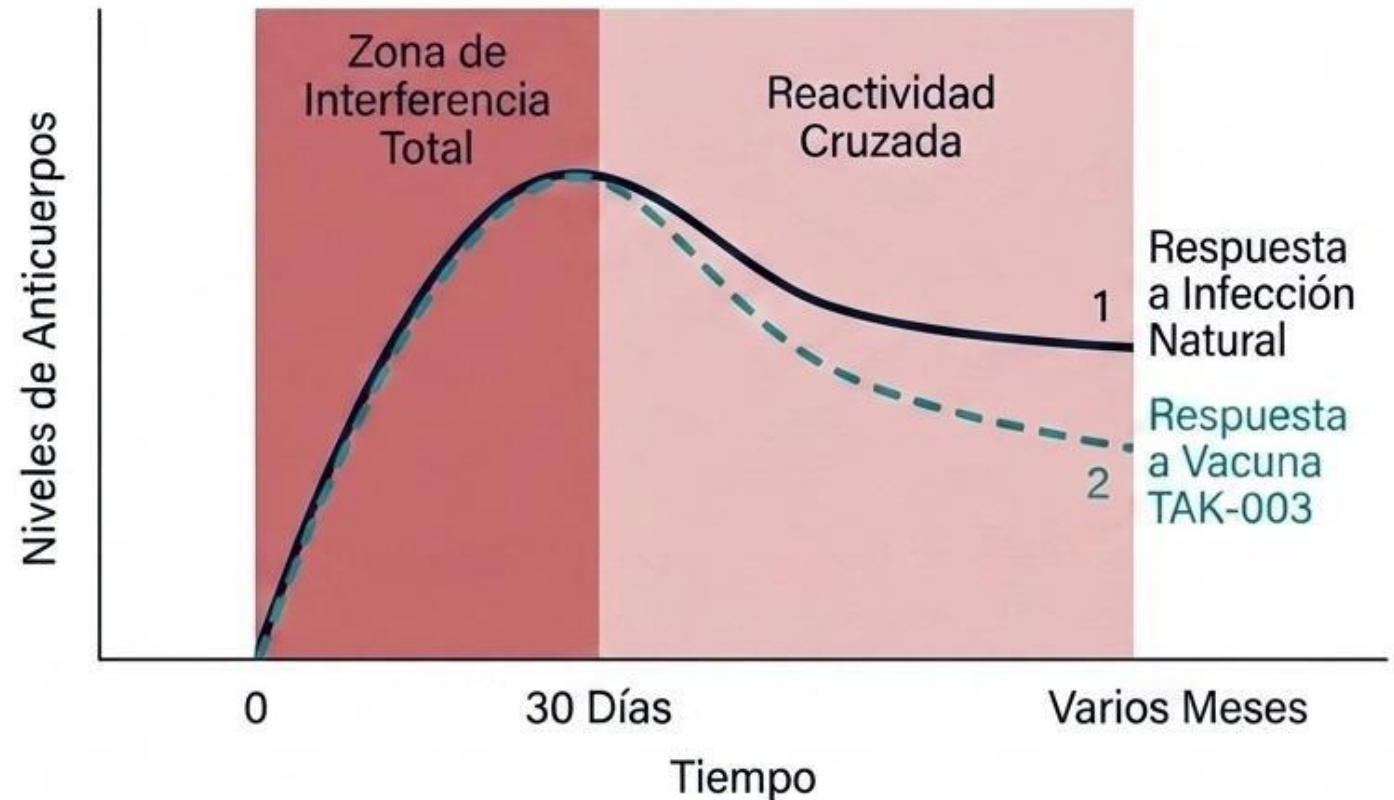
Incapacidad de Diferenciación (ELISA)

Durante los primeros 30 días post-vacunación, los perfiles de anticuerpos inducidos por TAK-003 son idénticos a los de una infección natural.

Reactividad Cruzada Persistente

La interferencia serológica se mantiene durante varios meses. Las vacunas contra la Fiebre Amarilla añaden una capa adicional de reactividad cruzada y falsos positivos.

Perfiles de IgM e IgG: La Ventana de Confusión



La arquitectura quimérica de la vacuna provoca reactividad cruzada en pruebas RT-PCR.



Detección de la Cepa Vacunal

Como vacuna de virus vivo atenuado, TAK-003 genera viremia. Las sondas PCR para DENV-2, 3 y 4 pueden reconocer erróneamente el material genético de la vacuna.

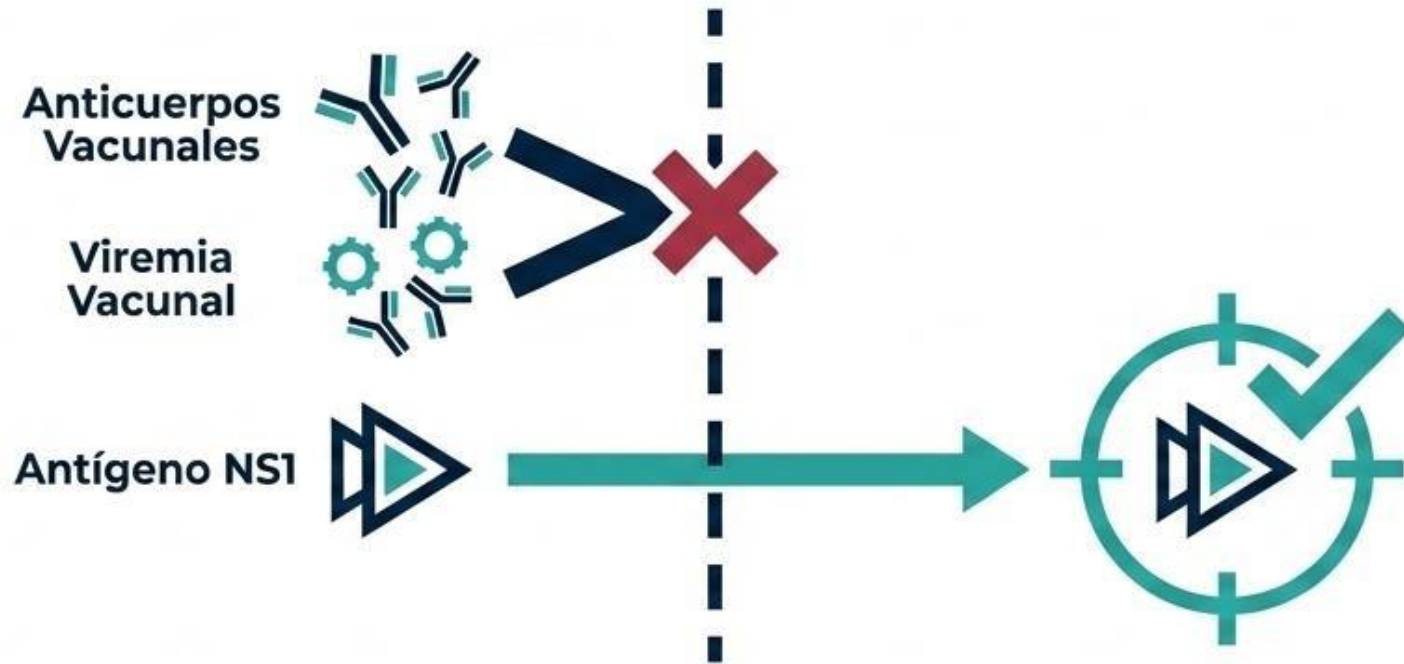
El Punto Ciego de DENV-1

La RT-PCR para DENV-1 probablemente no detecte la vacuna. TAK-003 utiliza un esqueleto de DENV-2 en la región NS5, exactamente donde amplifican los reactivos estándar para DENV-1.

Requisito de Confirmación

Un resultado positivo por RT-PCR exige secuenciación genómica para distinguir el virus salvaje circulante de la cepa vacunal.

El antígeno NS1 es el único biomarcador libre de interferencia vacunal.



La Excepción Crítica de TAK-003

La investigación clínica demuestra de manera concluyente que la vacunación con **TAK-003 no produce antígeno NS1 detectable en sangre.**

Validación Diagnóstica

Esto convierte a la detección del antígeno NS1 por técnica **ELISA** en la herramienta fundamental del laboratorio. Un resultado NS1 positivo en un paciente vacunado indica, con altísima probabilidad, una infección real por virus salvaje.

Fiabilidad diagnóstica en pacientes vacunados con Tak-003

Prueba Diagnóstica	Interferencia Vacunal	Utilidad Clínica Post-Vacuna
Serología (ELISA IgM/IgG)	Alta (Mimetismo inicial y reactividad cruzada prolongada)	Evitar como prueba única de diagnóstico agudo.
Molecular (RT-PCR)	Moderada / Alta (Viremia vacunal detectable)	Uso con precaución. Requiere secuenciación genómica confirmatoria.
Antígeno NS1 (ELISA)	Nula (No detectable post-vacunación)	Prueba de elección primaria y altamente fiable.

En resumen: Algunas situaciones problemáticas para el diagnóstico



Persistencia de IgM de brotes recientes



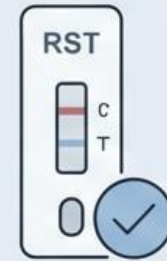
Serología: reacciones cruzadas entre arbovirus co-circulantes y detección de anticuerpos producidos por vacunación



Diagnóstico diferencial de otros agentes virales: B19, Oropuche



Bancos de sangre y procuración de órganos: presencia de viremia previo al inicio de fiebre



Desempeño de los tests rápidos



Casos sospechosos sin ficha epidemiológica o con datos incompletos



Coinfecciones



Conclusiones

- El diagnóstico de los arbovirus es complejo, debido a las múltiples **reacciones cruzadas** que presentan
- Los esfuerzos deben estar destinados a estudiar pacientes en **período agudo** (< 7 días), para aumentar las posibilidades de obtener **CASOS CONFIRMADOS** y no **CASOS PROBABLES O SOSPECHOSOS NO CONCLUSIVOS**
- Es indispensable combinar **múltiples técnicas** para lograr la correcta identificación viral
- Resulta imprescindible que las muestras sean acompañadas por la **ficha epidemiológica**
- El algoritmo de diagnóstico debe tener en cuenta el **escenario epidemiológico** al momento del estudio

El tiempo es la variable más crítica en el diagnóstico

El virus del dengue y el sistema inmunológico del huésped compiten en una carrera de dos semanas.

Una prueba perfectamente ejecutada en el día equivocado de la evolución de los síntomas garantiza un falso negativo.



Artículos Científicos y Revisiones (Peer-Reviewed)

- **Bifani, A. M., et al. (2021).** *Attenuated Dengue Viruses are Genetically More Diverse Than Their Respective Wild-Type Parents.* npj Vaccines, 6(76).
- **Butrapet, S., et al. (2000).** *Attenuation Markers of a Candidate Dengue Type 2 Vaccine Virus, Strain 16681 (PDK-53), Are Defined by Mutations in the 5' Noncoding Region and Nonstructural Proteins 1 and 3.* Journal of Virology, 74(7), 3011–3019.
- **Chong, Z. L., et al. (2020).** *Diagnostic accuracy and utility of three dengue diagnostic tests for the diagnosis of acute dengue infection in Malaysia.* BMC Infectious Diseases, 20(210).
- **Guo, C., et al. (2017).** *Global Epidemiology of Dengue Outbreaks in 1990–2015: A Systematic Review and Meta-Analysis.* Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 7(317).
- **Hou, J., et al. (2022).** *Current Development and Challenges of Tetravalent Live-Attenuated Dengue Vaccines.* Frontiers in Immunology, 13(840104).
- **Kerkhof, K., et al. (2019).** *Reliable Serological Diagnostic Tests for Arboviruses: Feasible or Utopia?* Trends in Microbiology.
- **Low, J. G., et al. (2024).** *IgG, IgM, and NS1 Profiles after Dengue Vaccine TAK-003.* American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 111(1), 102–106.
- **Shaibu, J. O., et al. (2023).** *Molecular surveillance of arboviruses in Nigeria.* BMC Infectious Diseases, 23(538).
- **Sirisena, P. D. N. N., et al. (2021).** *Concurrent dengue infections: Epidemiology & clinical implications.* Indian Journal of Medical Research, 154, 669-679.
- **Thomas, S. J. (2023).** *Is new dengue vaccine efficacy data a relief or a cause for concern?* npj Vaccines, 8(55).
- **Torres-Flores, J. M., et al. (2022).** *Dengue Vaccines: An Update.* BioDrugs, 36, 325–336.
- **Trivedi, S., & Chakravarty, A. (2022).** *Neurological Complications of Dengue Fever.* Current Neurology and Neuroscience Reports, 22, 515–529.
- **Valdivia-Conroy, B., et al. (2022).** *Diagnostic performance of the rapid test for the detection of NS1 antigen and IgM and IgG anti-antibodies against dengue virus.* Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, 39(4), 434-41.
- **Valinotto, L. E., et al. (2012).** *Molecular evidence of St. Louis encephalitis virus infection in patients in Buenos Aires, Argentina.* Journal of Clinical Virology, 54, 349–351.

Guías y Directrices de Organismos de Salud (CDC / OMS)

- **CDC (2024-2025).** *Clinical Testing Guidance for Dengue.* Centers for Disease Control and Prevention.
- **CDC (2025).** *Molecular Tests for Dengue Virus.* Centers for Disease Control and Prevention.
- **CDC (2025).** *NS1 Antigen Tests for Dengue Virus.* Centers for Disease Control and Prevention.
- **CDC (2025).** *Ongoing Risk of Dengue Virus Infections and Updated Testing Recommendations in the United States.* Health Alert Network (HAN).
- **CDC (2025).** *Serologic Tests for Dengue Virus.* Centers for Disease Control and Prevention.
- **OMS (2009).** *Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control - New Edition.* World Health Organization.
- **OMS (2024).** *Dengue Outbreak Toolbox.* World Health Organization.
- **OMS (2025).** *Laboratory testing for dengue virus: Interim guidance.* World Health Organization.

Protocolos Locales y Materiales Técnicos

- **Fabbri, C., & Morales, M. A. (2023).** *Análisis del algoritmo de dengue y criterios en contexto de epidemias recientes y uso de vacuna- consideraciones iniciales.* INEVH “Dr. Julio I. Maiztegui”, Argentina.
- **Ministerio de Salud de la Nación, Argentina (2024).** *Algoritmo de diagnóstico y notificación de dengue a través del SNVS 2.0.*
- **Mayo Clinic Laboratories.** *DNSAG: Dengue Virus NS1 Antigen, Serum (Test Definition).*
- **Mayo Clinic Laboratories.** *Dengue Virus Antibody, IgG and IgM, Serum.*



Nuestro equipo

- Acevedo, María Elina
- Alexay, Sofía
- Alvarez López, Cristina
- Barquez, Raquel
- Beltrán, Carla
- Delucchi, Karina
- Demesa, Rosana
- González, Mónica
- Jacquez, Oscar
- Luna, Oscar
- Lusso, Silvina
- Martínez, Yamila
- Mistchenko, Alicia
- Natale, Mónica
- Turchiaro, Christian
- Valinotto, Laura
- Zacarías, Karina



Muchas gracias!

crisalvarezlopez@gmail.com

virologiaonline@gmail.com