

DIAGNÓSTICO TEMPRANO DEL VIRUS DENGUE 1 USANDO RT-PCR Y PERSPECTIVAS PARA LA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS AUTÓCTONAS

Yábar C¹, Carrillo C³, Nolasco O¹, García M², Montoya Y.¹

¹División de Biología Molecular, Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud.

²División de Virología, Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud.

³Laboratorio de Microbiología, Universidad Peruana Cayetano Heredia.

RESUMEN

Un sistema de diagnóstico para la detección temprana del virus Dengue 1 fue llevado a cabo exitosamente usando la reacción en cadena por polimerasa de transcriptasa reversa (RT-PCR), a través de la amplificación de una porción genómica del gen NS1. Los resultados obtenidos, a partir de muestras clínicas, corroboraron los datos de anteriores trabajos de RT-PCR dirigidos hacia la región estructural del virión. Posteriormente el ADNc del virus Dengue, correspondiente a una de las muestras serológicas, fue clonado y secuenciado. La comparación por análisis de secuencia nucleotídica con otras cepas referenciales determinó que la cepa viral correspondía al serotipo 1.

Palabras clave: Dengue, diagnóstico, reacción en cadena por polimerasa de transcriptasa reversa.

ABSTRACT

A diagnosis system for the early detection of Dengue virus was carried out by amplification of the NS1 gene portion using RT-PCR. Results obtained from clinical samples corresponded to previous RT-PCR works aimed at the structural region of the virion. Dengue cDNA from one of the sera samples was then cloned and sequenced. Comparison by nucleotide sequence analysis with other reference strains determined that this viral strain was Dengue serotype 1.

Key words: Dengue, diagnosis, reverse transcriptase polymerase chain reaction.

INTRODUCCIÓN

El dengue, es una enfermedad causada por un virus perteneciente a la familia *Flaviviridae*, transmitido al hombre a través de la picadura del mosquito *Aedes aegypti*¹. Existen cuatro serotipos antigénicamente distintos denominados DEN1, DEN2, DEN3 y DEN4¹.

La infección por el virus Dengue afecta a más de 100 países a nivel mundial, por lo que ha sido considerado un problema de salud pública². Es importante mencionar que la presencia de dos serotipos diferentes de dengue en una misma región pone en riesgo a la población de contraer Fiebre hemorrágica (FHD) o Síndrome del shock (SSD) por Dengue³. En el Perú la presencia de los serotipos 1 y 2 ha sido determinados recientemente en la selva norte y central, así como también en la costa norte del país⁴. Por otro lado, es importante señalar que el DEN 1 ha incrementado significativamente su área de infección en nuestro territorio, principalmente en los departamentos de Tumbes, Piura, Lambayeque, Loreto, San Martín, Ucayali y Junín⁴. Por esta razón, es necesario mantener una constante vigilancia epidemiológica de este serotipo con el fin de evitar algún brote de tipo hemorrágico.

El virus del dengue presenta un genoma de ARN de cadena simple y de sentido positivo, que tiene un

tamaño de aproximadamente 11kb, y codifica para una simple poliproteína, que sufre sucesivos cortes para generar proteínas virales individuales⁵. Las tres proteínas estructurales C, M y E están localizadas en el extremo aminoterminal, mientras que las proteínas no estructurales NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5, están en el extremo carboxilo de la poliproteína⁵.

Con respecto a los sistemas de diagnóstico para la detección de dengue en nuestro país, han sido estandarizados el cultivo celular y la prueba serológica de MAC-ELISA. Sin embargo, el desarrollo del efecto citopático, como evidencia de la presencia del virus en el cultivo celular, requiere un tiempo prolongado. Por otro lado, la frecuencia de reacción cruzada en el MAC-ELISA, hace a este diagnóstico no muy específico para efectos de obtener un resultado confirmatorio. Mediante el sistema de RT-PCR se ha podido diagnosticar dengue desde el primer día de enfermedad⁶.

Este artículo informa sobre la validación de un sistema alternativo de RT-PCR para la detección de dengue tipo 1 a partir de muestras clínicas, dirigiendo la especificidad de los oligonucleótidos hacia la región no estructural del virus (gen de la glicoproteína NS1)⁷. Mediante este sistema se espera obtener los mismos parámetros de especificidad y sensibilidad de los oligonucleótidos dirigidos hacia la región estructural del virión⁶ y, de esta manera, contar con otro sistema opcional de RT-PCR para el diagnóstico temprano de dengue.

Correspondencia: Carlos Yábar. Instituto Nacional de Salud. Calle Cápac Yupanqui 1400, Lima 11, Perú. Apartado postal 471. Telf.: (0511) 4719920 - Fax: (0511) 4710179. Email: biomole@ins.sld.pe

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL SEROLÓGICO

Un grupo de 60 muestras serológicas fueron obtenidas durante un brote epidémico ocurrido en Máncora-Piura. Los sueros fueron clasificados en dos grupos: el primero correspondió a diez controles negativos de personas sanas, mientras que el segundo de cincuenta muestras de sueros positivos de personas con diagnóstico clínico y serológico de dengue. Todas estas muestras fueron evaluadas previamente por MAC-ELISA y RT-PCR y tipificadas como dengue 1 por IFI y Nested PCR⁶.

CULTIVOS VIRALES

Las cepas referenciales del virus dengue 1 (Hawaii), Dengue 2 (New Guinea), dengue 3 (H-87) y dengue 4 (H-241) para los controles positivos, y las cepas referenciales de flavivirus, relacionadas con Fiebre amarilla y Virus de West Nile, para el control de especificidad, fueron incubadas en líneas celulares de mosquito *Aedes albopictus* C6/36 a 28° C en un medio mínimo esencial (MEM).

RT-PCR

El genoma viral fue extraído y purificado de acuerdo a métodos previamente descritos. Para la reacción de la transcripción reversa se utilizó el oligonucleótido reverso denominado AD3⁷. Asimismo, se incluyó la enzima transcriptasa reversa Rav-2 (Amersham Pharmacia[®]) para luego someter la mezcla de reacción a una incubación en baño María por 1h a 42°C.

La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo utilizando los cebadores AD3 y AD4⁷, específico para una región ubicada en la posición 3400 del gen de la glicoproteína NS1, así como también la enzima Taq Gold ADN Polimerasa (Perkin Elmer[®]). La reacción se llevó a cabo en un Termociclador Perkin Elmer 9600 y las condiciones de PCR fueron realizadas de acuerdo a Henchal y col⁷. con algunas modificaciones: Denaturación inicial a 95°C por 6 minutos, 30 ciclos a 94°C por 1 minuto, 45°C por 1 minuto, y 72°C por 1 minuto, para luego concluir la reacción con una extensión final a 72°C por 7 minutos. Posteriormente 5 µl de producto de PCR fueron resueltos en minigeles de agarosa al 1,5% y visualizados en luz UV, después de una previa incubación en Bromuro de Etilio.

CLONACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN

Los productos de amplificación fueron purificados, cuantificados y ligados a un vector plasmídico pGEMT-Easy (Promega[®]). Una línea celular de bacterias electrocompetentes JM109 (Stratagene[®]) fue transformada con el plásmido recombinante mediante electroporación. Los clones recombinantes fueron seleccionados de acuerdo a un ensayo colorimétrico utilizando X-gal e IPTG, luego fueron incubados en caldo LB ampicilina y el ADN plasmídico fue purificado y cuantificado para ser sometido a la reacción de secuenciación.

SECUENCIAMIENTO

Los plásmidos recombinantes, conteniendo el inserto de ADN de interés, fueron sometidos a la reacción de secuenciación mediante el método dydeoxi utilizando primers marcados. La reacción se llevó a cabo utilizando el Sistema Autocycle mediante el uso de la enzima Taq Polimerasa. El secuenciamiento de ADNc se realizó en un equipo de secuenciamiento ALF express mediante electroforesis por 10 horas.

RESULTADOS

RT-PCR

El producto esperado correspondió a una banda de ADN de 419 pb, tal como se muestra en la Figura 1. La concentración óptima de MgCl fue de 2 mM, luego de la cual ocurrió una disminución en la intensidad de la banda (ver Figura 2). El ARN viral de la cepa Hawaii correspondiente al serotipo 1, fue exitosamente amplificado. Para determinar la efectividad del sistema a partir de suero, una muestra clínica correspondiente a un paciente, con sospecha de dengue 1, fue evaluada obteniéndose satisfactoriamente la banda de diagnóstico esperada. Es importante resaltar que estas muestras de cultivo y de suero de dengue 1 fueron evaluadas antes por Nolasco y col⁶ obteniéndose en este trabajo los mismos resultados de reactividad.

Asimismo, la ausencia de la banda en el control negativo y cepas referenciales de otros flavivirus relacionados, corrobora la especificidad del sistema.

SECUENCIAMIENTO DEL PLÁSMIDO RECOMBINANTE

Luego de haber clonado el producto de PCR en el plásmido pGEMT-easy, el inserto de ADNc fue sometido a un proceso de secuenciación utilizando un secuenciador automático ALF Express. En ese sentido, una lectura de aproximadamente 100 pares de bases con 6 ambigüedades en la hebra positiva fue obtenida durante esta reacción, mientras que por el sector de la hebra complementaria, una lectura máxima de casi 475 pb con 5 ambigüedades pudo ser determinada.

DISCUSIÓN

El diagnóstico del dengue mediante RT-PCR ha sido desarrollado por diversos autores⁷⁻¹¹. Estos estudios demostraron que, mediante esta técnica, el ARN viral es detectado en casi un 90% y que, además, los métodos inmunoenzimáticos alcanzan este porcentaje de sensibilidad⁶. Con respecto a las pruebas inmunológicas, el desarrollo de un nuevo Kit de diagnóstico conocido como *Dip-S-Ticks*[®] ha mejorado el sistema de diagnóstico para la detección de anticuerpos IgM frente al virus dengue. Sin embargo, la especificidad y sensibilidad de cualquier sistema inmunoenzimático no es comparable con el RT-PCR, durante los primeros cinco días de la enfermedad^{6,12}. Empero, el uso combinado de estas dos técnicas facilitaría grandemente la detección temprana de la enfermedad del dengue, disminuyen-

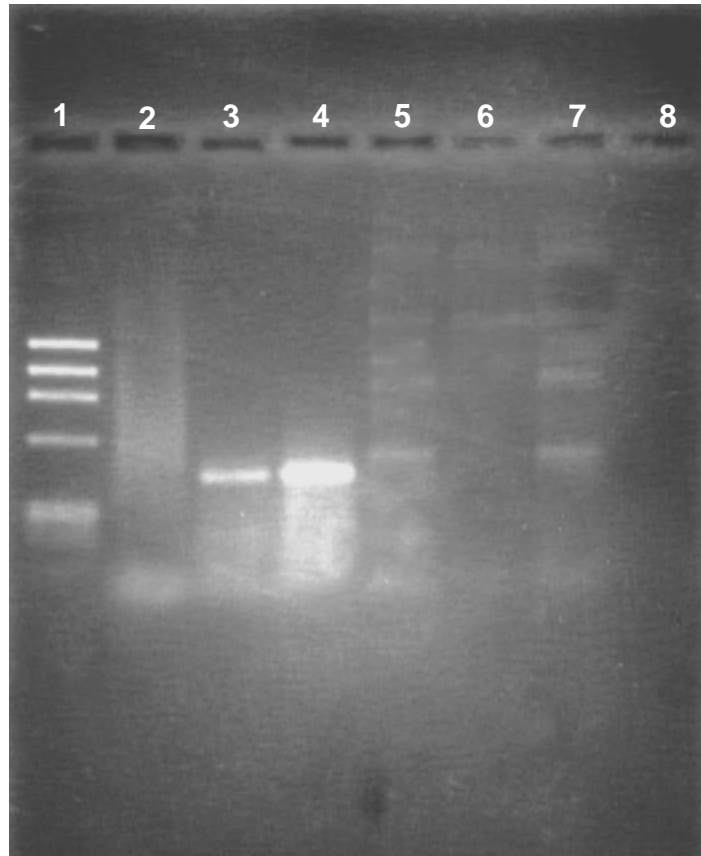


Figura 1. Especificidad de los productos de amplificación de 419 pb bases correspondiente al gen de la glicoproteína NS1 del virus dengue 1. Carril 1: Marcador de peso molecular ØX174. Carril 2: Control negativo suero normal. Carril 3: Control positivo dengue 1 referencial, cepa Hawaii. Carril 4: dengue 1 suero autóctono de Máncora-Perú. Carril 5: Virus de la fiebre amarilla. Carril 6: Virus de West Nile. Carril 7: Control del Sistema.

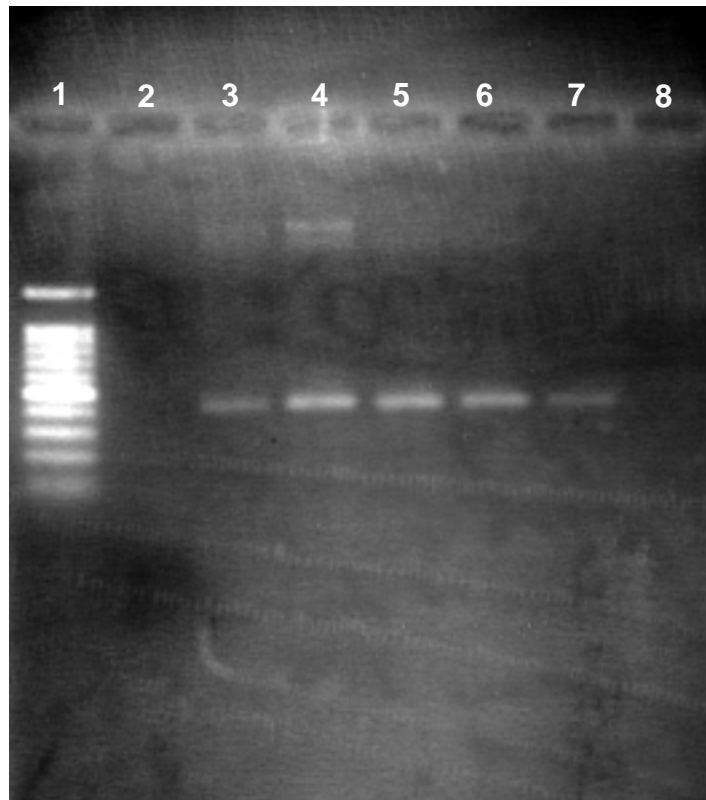


Figura 2. Curva de $MgCl_2$ de los productos de amplificación de 419 pb bases correspondiente al gen de la glicoproteína NS1 del virus dengue 1. Carril 1: Marcador de peso molecular Ladder. Carril 2 : 0 mM. Carril 3: 1 mM. Carril 4: 2 mM. Carril 5 : 3mM. Carril 6: 4mM. Carril 7: 5mM.

do el riesgo de obtener resultados indeterminados o reacciones cruzadas.

Por otra parte, el secuenciamiento de ADNc ha permitido corroborar la especificidad y sensibilidad de los oligonucleótidos universales AD3 y AD4, los cuales lograron amplificar una región de 419 pb del gen de la glicoproteína NS1 del virus dengue 1 autóctono de Máncora-Piura (ver Figura 2). Asimismo, muestras de ARN viral extraídas a partir de cultivos celulares de dengue 2, autóctono de la selva norte del país, han sido exitosamente reconocidas por estos cebadores, lográndose obtener la banda esperada de 419 pb (datos no mostrados). La secuencia completa de esta región de NS1 en el virus Dengue 1 fue recientemente registrada en el Banco de Genes¹³ y en la actualidad está siendo analizada y comparada con otras cepas referenciales de dengue. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos permitirán la realización del análisis molecular de esta región de NS1 y sus implicancias en la virulencia del virus.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al CDC de Atlanta, EEUU, por proporcionarnos las cepas referenciales del virus dengue 1 (Hawaii), dengue 2 (New Guinea), dengue 3 (H-87) y dengue 4 (H-241).

A los señores técnicos Juana Choque Portilla y David García Neyra, de la División de Biología Molecular por su entusiasta colaboración.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Gubler DJ.** Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 480-6.
2. **World Health Organization.** The World Health Report 1996. Fighting disease for a better development. Geneva, 1996.
3. **Halstead S.** Pathogenesis of dengue. Challenge to molecular biology. *Science* 1988; 239: 76-81.
4. **García M, Cabezas C, Callahán J, Yana B, Gutiérrez V, Ortiz A, Anaya E.** Determinación de IgG y anticuerpos totales contra el virus dengue, en muestras obtenidas en papel filtro. *Rev Med Exp INS* 1997; 14 : 45-9.
5. **Chambers T, Hahn C, Galler R, Rice C.** Flavivirus genome organization, expression, and replication. *An Rev Microbiol* 1990; 44: 649-88.
6. **Nolasco O, Carrillo C, Gutiérrez V, Yábar C, Douglas S, García M, Montoya Y.** Diagnóstico temprano en un brote epidémico del virus dengue en Piura usando RT-PCR y Nested-PCR. *Rev Med Exp INS* 1997; 14: 13-17.
7. **Henchal E, Polo SL, Vorndam V, Yaemsiri C, Innis BL, Hoke CH.** Sensitivity and specificity of a universal primers set for the rapid diagnosis of dengue virus infections by polymerase chain reaction and nucleic acid hybridization. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 45: 418-28.
8. **Lanciotti R, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV.** Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 545-51.
9. **Puri B, Henchal EA, Burans J, Porter KR, Nelson W, Watts DM, et al.** A rapid method for detection and identification of flaviviruses by polymerase chain reaction and nucleic acid hybridization. *Arch Virol* 1994; 134: 29-37.
10. **Pierre V, Drouet MT, Deubel V.** Identification of mosquito-borne flavivirus sequences using universal primers and reverse transcription/polymerase chain reaction. *Res Virol* 1994; 145: 93-104.
11. **Tadeu M, Chelli W, Kashima S, Da Silva E.** Identification of brazilian flaviviruses by a simplified reverse transcription-polymerase chain reaction method using flavivirus universal primers. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59: 357-62.
12. **Innis B, Nisalak A, Nimmannitya S, Kusalerdchariya S, Chongswasdi V, Suntayakorn S, et al.** An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and japanese encephalitis co-circulate. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 40: 418-27.
13. **Yabar C, Carrillo C, Nolasco O, Garcia M, Montoya Y.** Partial genomic analysis of the glycoprotein of the dengue virus type1 from Máncora-Piura, 1998. Access number AFO97020.