

Desarrollo de RT-PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa del inglés Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) para la detección y tipificación de virus del dengue. Avances de investigación.

Velázquez-Quiroz Isaac R.^{1,2}, Jiménez-Estrada Juan Manuel², Salas Benito Juan³, Zárate Segura Paola¹, Molina Angeles Miguel A.², Ramirez-Hernández Ma. Dolores², Medina Torres Imelda⁴, Aguilar-Faisal Jose Leopoldo¹.

*Maestría en Ciencias de la Salud, Laboratorio de Medicina de Conservación, Escuela Superior de Medicina, IPN.¹
Laboratorio Estatal de Salud Pública, Laboratorio de Biología Molecular, ISEM.²
Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, IPN.³
Subdirección de Epidemiología, ISEM.⁴*

Resumen

En la actualidad el dengue es la segunda enfermedad más importante de las transmitidas por artrópodos que afectan al ser humano, después de la malaria. Se estima que la tasa de infección en el mundo es de más de 100 millones de individuos al año, de los cuales 500,000 desarrollan las manifestaciones clínicas más severas. Más de 100 países han informado de la presencia de esta enfermedad en su territorio. El diagnóstico de laboratorio es esencial para la confirmación del dengue, éste incluye técnicas de aislamiento e identificación del virus, de diagnóstico serológico y de biología molecular. La detección de antígenos virales en sueros vírémicos es necesaria para las investigaciones clínicas y epidemiológicas y debe realizarse rápidamente para implantar tempranamente el tratamiento anti-choque a los enfermos y para la detección precoz de un brote.

Objetivo

Con el presente estudio se pretendió determinar la presencia de dengue y sus sero-variedades en pacientes de la red hospitalaria del Instituto de Salud del Estado de México.

Material y métodos

Se colectó suero y sangre completa de los pacientes en las unidades hospitalarias de referencia y estas se remitieron en un lapso menor a 72 horas posteriores a la toma al Laboratorio Estatal de Salud Pública del ISEM. El RNA viral se extrajo a partir de las muestras de sangre completa.

Resultados

Los resultados obtenidos mediante RT-PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa del inglés *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) se compararon con los resultados oficiales emitidos al SINAVE (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica). Las muestras que resultaron positivas a dengue por RT-PCR se cultivaron en células VERO, después de 7 días se analizaron de nuevo por RT-PCR y se confirmó el resultado, siendo todas positivas.

Conclusión

La detección del virus del dengue por RT-PCR con los iniciadores IRVQ(1-4)F e IRVQ(1-4)R es adecuada para la detección temprana en muestras de suero que proceden de pacientes sospechosos de padecer dengue.

Palabras clave: *virus del dengue, fiebre por dengue, fiebre hemorrágica por dengue, Aedes aegypti.*

Introducción

Más de dos quintas partes de la población mundial viven en zonas en riesgo para dengue y más de 100 países han informado de la presencia de esta enfermedad en su territorio, Las Américas ha sido una de las regiones más afectadas por el dengue y su forma más grave, la fiebre hemorrágica por dengue (FHD)¹. Cada año se infectan a nivel mundial aproximadamente 50 millones de personas con este virus, 500,000 de ellos desarrollan una forma grave de la enfermedad y más de 12,000 muertes^{2,3}.

Los primeros brotes epidémicos de dengue fueron documentados entre 1779 y 1790 en África, Asia y América del Norte. De 1780 hasta 1940 también se documentaron epidemias asociadas con dengue pero con menor frecuencia^{2,3}.

Las primeras epidemias por dengue en América ocurrieron en las Antillas Francesas en 1635 y en Panamá en 1699. La primera vez que se describió la fiebre por dengue (FH) y el síndrome de choque por dengue (SCD) como entidades



clínicamente definidas fue hasta 1954 durante el brote ocurrido en Filipinas; en 1981 el dengue tomó notoriedad con el brote FHD en Cuba seguido de otro en Venezuela⁴.

De 1947 hasta la década de los sesentas, la Secretaría de Salud en México realizó intensivas campañas de erradicación contra el vector transmisor del virus de dengue: *Aedes aegypti*, y aunque el mosquito fue declarado oficialmente erradicado del país en 1963, dos años después fue detectado de nuevo. La peor epidemia de la enfermedad producida por el serotipo 1 fue reportado en la costa oriental de México durante 1979-1980². Durante 1981, se registraron aproximadamente 17,000 casos y para 1984 y 1985 se diagnosticó dengue en 25 de los 32 estados del País; para 2009, de manera oficial se reportaron casos en los estados de Querétaro, Jalisco, Nayarit, Tabasco y Guerrero (165,748 casos sospechosos)^{2,3}.

Generalidades del Dengue

En la actualidad el dengue es la segunda enfermedad más importante de las transmitidas por artrópodos que afectan al ser humano, después de la malaria. Se estima que la tasa de infección en el mundo es de más de 100 millones de individuos al año, de los cuales 500,000 desarrollan las manifestaciones clínicas más severas⁵.

El dengue es una enfermedad infecciosa grave de origen viral transmitida por mosquitos. Constituye una causa importante de muerte, afecta a personas que viven en áreas urbanas que se localizan en regiones tropicales y subtropicales. Se puede manifestar en tres formas denominadas: fiebre por dengue o dengue clásico (FD), fiebre hemorrágica por dengue o dengue hemorrágico (FHD) y síndrome de choque por dengue (SCD); las últimas dos formas son complicaciones potencialmente fatales y se caracterizan por la presencia de permeabilidad vascular anormal⁶.

Inicialmente, la infección por el virus del dengue puede pasar desapercibida por ser asintomática o bien manifestarse inespecíficamente como FD, caracterizada por fiebre alta, dolor retro-ocular, mialgias y artralgias. La FD rara vez persiste más de siete días; sin embargo, los pacientes presentan una larga convalecencia, durante la cual se pueden presentar síntomas neurológicos residuales como fatiga y lasitud, que pueden durar meses. En una pequeña proporción de los casos, particularmente infecciones secundarias con un serotipo diferente al que causó la infección inicial, el virus causa FHD que se caracteriza por incremento en la permeabilidad vascular, diátesis hemorrágica y potencialmente choque hipovolémico y distributivo. De esta manera, la FHD se caracteriza por hemoconcentración, trombocitopenia y colapso circulatorio, condición clínica que se asocia frecuentemente con disfunción severa de algunos órganos, como el hígado, bazo y el cerebro. Hasta la fecha muchos grupos se han dedicado al estudio de los factores que determinan los casos graves de la enfermedad, se conoce que la fisiopatogenia de la FHD es multifactorial, principalmente respecto al papel de la respuesta inmunitaria, incrementada por factores intrínsecos, tanto del virus como del huésped^{7,8}.

El diagnóstico diferencial de dengue se realiza principalmente con: Leptospirosis, Influenza, Encefalitis Virales, Brucelosis, Rickettsiosis, Rubéola y Enfermedad de Chagas debido a la similitud entre las manifestaciones clínicas⁹.

Características generales del virus del dengue

El virus del dengue pertenece a la familia Flaviviridae, género Flavivirus. Esta familia abarca a más de 70 agentes virales de los cuales al menos 30 causan infecciones serias al humano. Existen cuatro serotipos del virus del dengue (Dengue 1, Dengue 2, Dengue 3 y Dengue 4) todos ellos causantes de la enfermedad¹⁰.

Los virus del dengue se caracterizan por tener una cápside icosaédrica rodeada por una membrana lipídica o envoltura, con un diámetro aproximado de 50 nm. El genoma viral es RNA de cadena sencilla de polaridad positiva constituido por aproximadamente 11,000 nucleótidos que se encuentra encerrado en una cubierta proteica o cápside formada por la proteína C¹¹. En la bicapa existen dos proteínas importantes para el proceso de infección, la proteína de membrana (M) y la de envoltura (E). El genoma viral presenta la estructura "cap" en el extremo 5' y carece de poli(A) en el extremo 3' terminal. El único marco de lectura abierto está flanqueado por dos regiones no traducidas (UTR) y codifica tres proteínas estructurales: las proteínas E, prM (precursor de la proteína M) y la C; y a las siete proteínas no estructurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5^{12,13}.

Los genomas de los cuatro serotipos del virus comparten una homología en la secuencia nucleotídica de aproximadamente un 70%¹⁴. Cada genoma codifica para un precursor poliproteico de aproximadamente 3,400 aminoácidos del cual se generan las 10 proteínas virales antes mencionadas. Las proteínas C, prM y E forman la estructura de los viriones, mientras que las proteínas no estructurales (NS) son proteínas requeridas para la replicación y el ensamble del virión: Las proteínas NS1, NS3 y NS5 son extremadamente conservadas; las cuatro proteínas pequeñas NS2A, NS2B, NS4A y NS4B son hidrofóbicas. La NS2B y NS3 forman un complejo que funciona como proteasa; NS4A y NS4B son responsables de posicionar el complejo de replicación en la membrana del retículo endoplásmico y la proteína NS5 posee la función de RNA polimerasa dependiente de RNA¹⁵.

Algunas proteínas NS están asociadas con mecanismos virales de evasión de la respuesta inmune como es el caso con NS4B, NS2A y NS4A que inhiben la estimulación del gen para interferón (IFN) por interferencia con la función del factor de transcripción STAT1^{14,16}, mientras que NS5, además de funcionar como la RNA polimerasa viral, degrada y reduce el nivel de expresión de STAT2. Estas proteínas participan en la cascada de señalización inducida por los interferones α y β por lo que se ve inhibida la respuesta antiviral innata¹⁷.

Diagnóstico del dengue

El diagnóstico de laboratorio es esencial para la confirmación del dengue, éste incluye técnicas de aislamiento e identificación del virus, de diagnóstico serológico y de biología molecular¹⁸. La detección de antígenos virales



en sueros virémicos es necesaria para las investigaciones clínicas y epidemiológicas y debe realizarse rápidamente para implantar tempranamente el tratamiento anti-choque a los enfermos y para la detección precoz de un brote.

La viremia ocurre en la etapa temprana del período febril del dengue y su eliminación coincide con la disminución de la fiebre y el aumento de los niveles de anticuerpos, por lo que los resultados del aislamiento viral en muestras tomadas en el primer día de la aparición de los síntomas son por lo general positivas hasta en un 73 % de los casos¹⁹.

Referente al diagnóstico serológico, en la década de los 60 empezó a utilizarse una técnica de inhibición de la hemaglutinación con el fin de detectar anticuerpos totales contra los cuatro serotipos del virus del dengue y clasificar las infecciones en primarias o secundarias. En estudios recientes realizados en infecciones primarias sobre la cinética de la respuesta de anticuerpos, se demostró el incremento de las IgM, en prácticamente todos los pacientes, a los dos días de la disminución de la fiebre; con un pico en la respuesta aproximadamente a las dos semanas. En infecciones secundarias, la respuesta de anticuerpos IgM es variable, en algunas ocasiones está ausente o es muy baja, pero existe un marcado incremento de los de tipo IgG^{20, 21}.

El dengue, por ser de rápida transmisión, requiere de un sistema de vigilancia epidemiológica proactiva capaz de detectar tempranamente la propagación viral y predecir las epidemias, a fin de orientar las medidas de control con antelación al momento de transmisión máxima. La eficacia de este sistema depende de la capacidad de diagnóstico de laboratorio en la detección temprana de la circulación del virus y requiere de técnicas de laboratorio rápidas y confiables^{9, 22, 23}.

En el Estado de México, los casos de dengue confirmados por laboratorio se han presentado de la siguiente manera²⁴:

Tabla 1. Casos anuales de dengue, Estado de México.

AÑO	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
CASOS CONFIRMADOS	37	73	2	29	9	138	45	92	255	33

Objetivo

Determinar la presencia de dengue y sus sero-variedades en pacientes de la red hospitalaria del Instituto de Salud del Estado de México.

Método

Se colectó suero y sangre completa de los pacientes en las unidades hospitalarias de referencia y estas se remitieron en un lapso menor a 72 horas posteriores a la toma al Laboratorio Estatal de Salud Pública del ISEM.

El RNA viral se extrajo a partir de las muestras de sangre completa; se utilizó el kit QIAamp viral RNA Mini Kit cat. 52906 (QIAGEN, Inc., Valencia, CA) de acuerdo con el protocolo establecido por el fabricante y posteriormente se almacenaron en tubos eppendorf de 2 ml a menos 70° C.

Se diseñaron cuatro juegos de iniciadores in silico, uno para cada serotipo y para el desarrollo de los mismos se realizaron alineamientos de los genomas completos de cada serotipo en el software Vector NTI Advance versión 11.5 (Invitrogen), basándose el diseño en la región C-prM-E por ser altamente conservada.

Se realizó la mezcla para RT-PCR de la siguiente forma: 15QL de mix de reacción (0.5 QL de primer Forward, 0.5 QL de primer Reverse, 0.5 µL de SuperScript III RT/Platinum Taq, 6.25 µL de amortiguador de reacción 2X -dNTP's 0.4 µM y MgSO4 6 mM-, 14.25 µL de agua grado PCR) y 5 µL de muestra de RNA total, en microtubos de 200 µl.

Una vez realizada la RT-PCR las muestras se depositaron en un gel de agarosa al 1.5 %, y se desarrolló a 90V durante 75 minutos utilizando TAE (1X; 40 mM Tris-Acetato ph 8.0; 1mM de EDTA) como amortiguador de corrida, en una cámara de electroforesis Biorad, modelo Mini-Sub Cell GT con fuente de poder PowerPac Basic. Posteriormente fue teñido con bromuro de etidio por 10 minutos y se analizó en el trasluminador Biorad, modelo GelDoc XR+, esperando observar bandas de 443 pb para el virus del dengue, serotipo 1 (DENV-1), 780 pb para el serotipo 2 (DENV-2), 1059 pb para el serotipo 3 (DENV-3) y 839 pb para el serotipo 4 (DENV-4) en las muestras analizadas.

Los iniciadores se probaron con cepas de referencia: DENV1 cepa Hawaii, DENV2 cepa Nueva Guinea, DENV3 cepa H-87 y DENV4 cepa H-241. El producto de la RT-PCR se reamplificó, purificó y envió a un servicio de secuenciación (UNAM-IBT). Las secuencias de nucleótidos de cada muestra de control se alinearon en el programa Mega 4.0. Las secuencias obtenidas se compararon mediante el Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y fueron concordantes con las cepas y serotipos esperados.

Los resultados obtenidos mediante RT-PCR se compararon con los resultados oficiales emitidos al SINAVE, dichos diagnósticos basados en ELISA: Platelia® Dengue Ns1 Ag, Bio-Rad, determinación de IgG e IgM, así como RT-PCR en tiempo real.



Resultados

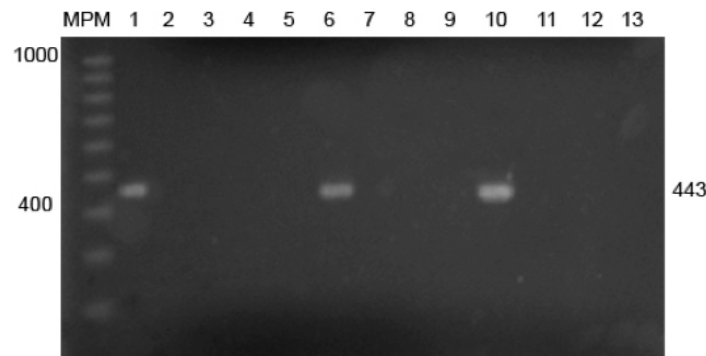
Se recibieron un total de 117 sueros provenientes de pacientes sospechosos de presentar FD en base al cuadro clínico; seis de las muestras no cumplieron con los parámetros de inclusión y fueron descartadas; siete más fueron referidas como control de calidad, quedando un total de 104 sueros sospechosos.

Todas las muestras recibidas para diagnóstico molecular fueron pareadas y remitidas por vía oficial al Laboratorio Estatal de Salud Pública del ISEM para su diagnóstico acorde a los lineamientos oficiales establecidos. Los datos de cada muestra fueron recabados según los reportes oficiales establecidos en la Plataforma Única del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE).

Se recibieron muestras de 16 Unidades de Salud, provenientes de 37 localidades; de las cuales el 51.9% (54) de las muestras pertenecían al sexo masculino, mientras que 50 (48.1%) al sexo femenino.

De las 111 muestras analizadas mediante RT-PCR: 11 (9.9%) fueron positivas a DENV-1 (*Figura 1*); 10 provenientes de muestras remitidas y 1 de control de calidad. El Hospital Municipal San Pedro Limón envió un total de 28 (26.4%) muestras provenientes de 15 localidades, resultaron 6 positivas; 4 masculinos y 2 femeninos, mientras que el Centro de Salud Rural Disperso Bejucos envió 8 (7.5%) muestras, de las que resultaron 4 positivas; 2 masculinos y 2 femeninos. Respecto al diagnóstico solicitado por laboratorio: 89 (80.2%) solicitaron NS1, 14 (12.6%) IgM, 4 (3.6%) IgG y 95 (85.6%) PCR.

Figura 1. Electroforesis de detección de DENV por RT-PCR en muestras de pacientes y controles. MPM, 1000 pb Biorad, 1.- DENV-1 cepa Hawaii, 443 pb; 2-5.- Suero 14, Negativo; 6-9.- Suero 15, Positivo DENV-1; 10-13.- Suero 16, Positivo DENV-1. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.



Acorde a lo reportado en el inserto de la prueba de ELISA: Platelia® Dengue NS1, Bio-Rad, (utilizada para el diagnóstico temprano de dengue) y mediante prueba de Kappa se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 2. Comparativa entre RT-PCR y NS1.

Prueba	Sensibilidad	Especificidad	Permite diferenciar serotipos	Valor predictivo positivo	Valor predictivo negativo	Concordancia entre pruebas	Índice de Kappa
NS1 ELISA	92.32%	100%	NO	90%	97%	98.9%	90.94
RT-PCR	100%	98%	SI	100%	98.9%		

Las muestras que resultaron positivas a Dengue por RT-PCR se cultivaron en células VERO, después de 7 días se analizaron de nuevo por RT-PCR y se confirmó el resultado, siendo todas positivas.

El tiempo promedio de procesamiento y emisión de resultados a partir de la recepción de la muestra remitida al Laboratorio de Biología Molecular del LESP del ISEM mediante el RT-PCR desarrollado fue de 6 horas. El tiempo promedio entre inicio de síntomas y toma de muestra fue de 4 días (0 días mínimo, 10 máximo); favoreciendo el apoyo diagnóstico del laboratorio al médico tratante, unidades de epidemiología asociadas y brigadas de control entomológico.



Discusión

Los estudios anteriores han demostrado que el RNA viral puede ser detectado en casi un 90% de las muestras clínicas y que los métodos inmunoenzimáticos (NS1, IgG, IgM) alcanzan un porcentaje de sensibilidad similar debido al perfeccionamiento tecnológico^{20, 21, 25}. Sin embargo, la especificidad y sensibilidad de cualquier sistema inmunoenzimático no es comparable con el RT-PCR durante los primeros siete días a partir de que se manifiestan signos y síntomas de la enfermedad, de tal manera que el uso combinado de métodos inmunoenzimáticos y RT-PCR facilitaría la detección temprana, disminuyendo el riesgo de obtener resultados indeterminados o reacciones cruzadas.

El análisis comparativo entre el diagnóstico mediante RT-PCR y Platelia™ NS1 Ag arroja que tanto la sensibilidad como el valor predictivo positivo reportada para RT-PCR es del 100%, con lo que se mejora la oportunidad en el diagnóstico temprano, identificando el serotipo involucrado y no sólo la presencia del virus.

Conclusión

La detección del virus del dengue por RT-PCR con los iniciadores IRVQ(1-4)F e IRVQ(1-4)R es adecuada para la detección temprana en muestras de suero que proceden de pacientes sospechosos de padecer dengue, ayudando a mejorar los indicadores epidemiológicos de Notificación Oportuna, Clasificación Oportuna y Tipificación Viral.

Referencias bibliográficas

- Gubler, D.J., Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clinical Microbiology Reviews*, 1998. 11(3): p. 480-496.
- Guzmán, M.G. and G. Kouri, Dengue: an update. *Lancet Infectious Diseases*, 2002.2: 33-42.
- OPS Actualización: Programa Regional de Dengue (17 de Noviembre de 2009). 2009.
- Vargas M, et al., Dengue clásico y hemorrágico: una enfermedad reemergente y emergente en el Perú. *Revista Medica Herediana*, 2005. 16(2): p. 120-140.
- WHO. Dengue and dengue haemorrhagic fever. Fact sheet no. 117. 2002; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>
- Henchal, A.E. and J.R. Putnak, The Dengue Viruses. *Journal Clinical Microbiology Reviews*, 1990. 3(4): p. 376-396.
- Gubler, D.J., Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiology*, 2002. 10: p. 100-103.
- Carrington Christine V.F., et al., Invasion and Maintenance of Dengue Virus Type 2 and Type 4 in the Americas. *Journal of Virology*, 2005. 79(23): p. 14680-14687.
- Lineamientos para la Vigilancia Epidemiológica de Fiebre por Dengue y Fiebre Hemorrágica por Dengue CENAVECE, Editor 2008, Secretaría de Salud.
- Malavige GN, et al., Dengue Viral Infections. *Postgrad Med J*, 2004. 80: p. 588-601.
- Rushika, P. and K.R. J., Structural Proteomics of Dengue Virus. *Curr Opin Microbiol.*, 2008. 11(4): p. 369-377.
- Henchal A.E., R.-P.J., The Dengue Viruses. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, 1990. 3(4): p. 376-396.
- Aquino H.V., et al., Molecular Epidemiology of Dengue Type 3 Virus in Brazil and Paraguay, 2002-2004. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2006. 75(4): p. 710-715.
- Rothman, A.L., ed. Dengue Virus. Primera Edición ed. *Courrent Topics in Microbiology and Immunology*, ed. R.W. Compans 2010, Springer. 15-30.
- Sansanee Noisakran and G.H. Perng, Alternate Hypothesis on the Pathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever (DHF)/Dengue Shock Syndrome (DSS) in Dengue Virus Infection. *Exp Biol Med* 2008. 233: p. 401-408.
- Holmes EC and S. Twiddy, The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol.*, 2003. 3(1): p. 19-28.
- Ashour, J.L.-R., M.; Shi, PY; García-Sastre, A., NS5 of Dengue Virus Mediates STAT2 Binding and Degradation. *Journal Of Virology*, 2009. 83(11): p. 5408-5418.
- M.P., C., El diagnóstico viral por el laboratorio., 2000, Colombia Médica p. 135-150.
- Vaughn DW, G.S., Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S., Dengue in the early febrile Phase: Viremia and antibody responses. *J Infect Dis*, 1997. 176: p. 322-330.
- Balmaseda A., e.a., Diagnosis of Dengue Virus Infection by Detection of Specific Immunoglobulin M (IgM) and IgA Antibodies in Serum and Saliva. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2003. 10(2): p. 317.
- SONGEE L. B. , P.N.L., Evaluation of Four Methods for Detection of Immunoglobulin M Antibodies to Dengue Virus. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 1999. 6(4): p. 555-557.
- WHO, in Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control 1997: Ginebra, Suiza. p. 34-47.
- Heymann, D.L., ed. El control de las enfermedades transmisibles. 18 ed. Publicación Científica y Técnica No. 6132005, Organización Panamericana de la Salud.
- ISEM, Programa Operativo Anual: Dengue 2010., D.d.Z.y. Vectores., Editor 2010.
- Bessoff K., e.a., Utility of a Commercial Nonstructural Protein 1 Antigen Capture Kit as a Dengue Virus Diagnostic Tool. *Clin. Vaccine Immunol*, 2010. 17(6): p. 949-956.