

CAPITULO 1: INTRODUCCION

1.1 Formulación del problema

La falta de sensibilidad en diversas técnicas empleadas para la detección de enfermedades como la fiebre del dengue, provoca falsos resultados que pueden perjudicar al paciente, el cual pierde la oportunidad de recibir un tratamiento adecuado. Es por esta razón que nace la necesidad de encontrar un método sensible y eficiente que proporcione resultados acertados y a tiempo para este grupo de población. (Callahan *et al*, 2001; Drosten *et al*, 2002). Las técnicas basadas en la biología molecular son una opción para proporcionar un diagnóstico y tratamiento apropiado y temprano durante el curso de determinadas enfermedades. (Harris *et al*, 1998)

Tomando en consideración la característica endémica de la infección por virus del dengue (DEN) en nuestro país, el presente proyecto plantea implementar sistemas de diagnóstico molecular de dengue (rápido, resultados disponibles en aproximadamente 8 horas) para poblaciones de alto riesgo.

1.2 Justificación del problema

La fiebre del dengue clásico y dengue hemorrágico están entre los retos más importantes en relación a enfermedades tropicales debido a su amplia distribución geográfica, al incremento de la frecuencia del brote, su hiperendemicidad y la evolución de la virulencia. (Lanciotti y Kerst, 2001; Ludolfs *et al*, 2002)

En los últimos años se ha observado un incremento cada vez más creciente de nuevas enfermedades infecciosas o de otras que ya se consideraban controladas, entre las que se encuentra el dengue (Klungthong, 2007). Las llamadas enfermedades emergentes y reemergentes son aquellas infecciones nuevas que han aparecido en una población o que han existido pero están aumentando rápidamente en incidencia o rango geográfico. Factores sociales y

económicos, de la atención médica, producción de alimentos, cambios en el comportamiento del hombre, cambios ambientales, deterioro de los sistemas de salud y adaptación y cambio de los microorganismos se relacionan con el surgimiento o resurgimiento de diferentes entidades. (Johnson *et al*, 2005; Lindegren *et al*, 2005)

Según la OMS más del 70% de la carga de morbilidad por esta enfermedad se concentra en Asia sudoriental y en la zona de Pacífico occidental. África y el Mediterráneo Oriental están menos afectados. En América Latina y el Caribe, la incidencia y gravedad de la enfermedad están aumentando rápidamente. El incremento de los viajes aéreos internacionales está favoreciendo la rápida propagación mundial de los virus del dengue. Con la llegada de virus nuevos a poblaciones vulnerables, el riesgo de epidemias de dengue hemorrágico aumenta.(Tavakoli *et al*, 2007)

Se calcula que aproximadamente 2.5 billones de personas están en riesgo de contraer infección por virus del dengue alrededor del mundo (Lanciotti *et al*, 1992; Lindegren *et al*, 2005; Paban *et al*, 2006).

En Ecuador la infección por virus del dengue tiene distribución endémica en particular en varias provincias de la Costa del país. Aunque el Ecuador reportó la erradicación completa de *A. aegyptis* en 1958, la falta de continuidad en los programas de control y erradicación llevó a reinfestación por *A. aegyptis* en la década de los 70' y 80' y al apareamiento de varios brotes epidémicos, siendo los más severos aquellos en Guayaquil en 1988, el cual afectó a aproximadamente 400.000 personas, (CDC, 1989) y la epidemia actual (2004-2005) que se ha extendido en varias provincias costeras afectando a por lo menos 500 personas incluyendo varias decenas de casos de DHF, lo cual requirió la declaratoria de emergencia sanitaria en estas zonas (CDC, 1995).

Técnicas nuevas basadas en análisis moleculares (análisis de ácidos nucleicos como ADN) son importantes para complementar la posibilidad de ofrecer a los pacientes un diagnóstico y tratamiento adecuado y precoz durante el curso de ciertas enfermedades. (Domingo *et al*, 2004) Estas técnicas son rápidas,

altamente sensibles y específicas y sirven como complemento al diagnóstico microbiológico tradicional (Mamani *et al*, 2005). El presente proyecto de grado tiene como objetivo utilizar una de estas técnicas basadas en análisis de ácidos nucleicos, la reacción en cadena de polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR) para la detección de virus dengue a partir de cultivos puros virales.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo General

- 1.3.1.1 Diseñar, optimizar e implementar un sistema de diagnóstico rápido de infección por virus del dengue en fase aguda mediante el uso de tecnología denominada Transcripción Reversa – Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

1.3.2 Objetivos Específicos

- 1.3.2.1 Optimizar una técnica de extracción y purificación del RNA viral para su uso específico en muestras clínicas en el Laboratorio de Biotecnología Humana de la Escuela Politécnica del Ejército
- 1.3.2.2 Desarrollar un sistema de transcripción reversa para la obtención de cDNA (DNA complementario a partir de RNA viral).
- 1.3.2.3 Identificar bandas específicas mediante un corrimiento electroforético de la muestra amplificada en el termociclador con el uso de marcadores de peso molecular, para poder identificar el serotipo específico del virus responsable de la infección.
- 1.3.2.4 Determinar la sensibilidad analítica del sistema, mediante un análisis logístico que permita verificar el límite de detección del ensayo.

1.4 Marco Teórico

1.4.1 El Dengue

1.4.1.1 Aspectos Epidemiológicos

El Dengue es conocido desde hace más de un siglo en las zonas tropicales de Asia Sudoriental y del Pacífico Occidental (Anderson y Rico-Hesse, 2006). La prevalencia de esta enfermedad se ha incrementado dramáticamente en las últimas décadas y ahora es endémica en más de 100 países de África, América, el Sudeste de Asia, Mediterráneo Oriental y Pacífico Occidental, llegando a afectar a más de 2.5 billones de personas (Yun Shu y Hsiung Huang, 2004).

En América ocurrieron epidemias esporádicas desde el siglo XIX hasta mediados del siglo XX y se ha convertido en una enfermedad endémica desde la década de 1970 (Gubler, 1998).

En el siglo 20 la primera epidemia de Dengue Clásico en América, comprobada por laboratorio, ocurrió en la región del Caribe y en Venezuela, el virus dengue 3 fue el serotipo circulante. En 1953-1954 en Trinidad se aisló por primera vez el agente causal de tipo 2 a partir de casos no epidémicos. En 1977 el serotipo Den-1 fue introducido en Jamaica y se diseminó por la mayoría de las islas del Caribe causando epidemias. El serotipo 4 fue introducido en 1981. El serotipo 3 reaparece desde 1994 en Nicaragua, este serotipo constituye un riesgo importante ya que ha sido asociado con la forma hemorrágica de la enfermedad (Rodríguez y Marzal, 2004).

En el Ecuador, para abril del 2006 se registraron 3.159 casos de dengue, de los cuales 3.059 son del tipo clásico y 100 del hemorrágico, causando la muerte de cinco personas (Instituto Pedro Kourí, 2006). En nuestro país la infección por dengue tiene una característica endémica con brotes epidémicos de variada magnitud. El brote actual se caracteriza por la presencia de varios casos de

dengue hemorrágico (reinfección), entidad que representa tasas de morbi-mortalidad mayores que la fiebre por dengue en sí (Johnson *et al*, 2005).

La sobrepoblación, el incremento de los viajes aéreos, las condiciones climáticas, la urbanización no planificada, las dificultades en el abastecimiento de agua, sumados al deterioro de los programas de control del vector, la carencia de insecticidas con buena relación de costo/efectividad y la falta de educación sanitaria son algunos de los factores relacionados con la diseminación del *Aedes aegypti* y al incremento en la circulación de los cuatro serotipos del virus (Domingo *et al*, 2004; Mercado *et al*, 2006; Preeti *et al*, 2008).

El país ha destinado en forma emergente recursos para controlar la epidemia. El foco del programa es la disminución de los vectores. Esta ha sido y es al momento la única estrategia efectiva de lucha contra la enfermedad. Sin embargo, el problema médico y de salud pública que representa el actual brote epidémico de dengue y su característica endémica en el país es de gran magnitud. Las estrategias de manejo clínico de pacientes con dengue se orientan hacia diagnóstico y tratamiento rápidos con el objetivo de bajar las tasas de complicaciones y mortalidad, disminuyendo así también los costos que demanda el manejo hospitalario de estos pacientes. (World Health Organization, 2002)

1.4.1.2 Etiología de la enfermedad

El Dengue es una enfermedad endémica viral que afecta a las zonas tropicales y subtropicales, principalmente en las áreas urbanas y suburbanas (Yun Shu y Hsiung Huang, 2004). Se ha convertido en un gran problema de salud pública de interés creciente ya que se producen 50 millones de infecciones anualmente, incluyendo 400 000 casos de dengue hemorrágico y 2.5 billones de personas afectadas (Kung Wang *et al*, 2000; Kung Wang *et al*, 2002; Reynes *et al*, 2003)

El dengue constituye una de las enfermedades de mayor repercusión en todos los países donde se presenta. El dengue clásico, junto con sus formas más graves: el dengue hemorrágico y el síndrome de shock por dengue son un serio problema de salud para muchos países de América y puede afectar negativamente a las economías nacionales de la región ya que estas epidemias originan altos costos de hospitalización, asistencia a enfermos y campañas de emergencia para el control de vectores (Liang Kao *et al*, 2005; Ortega, 2001).

El dengue es transmitido al hombre por la hembra del mosquito *Aedes aegypti* (Bente y Rico-Hesse, 2006; Reynes *et al*, 2003; Usawattanakul *et al*, 2002), el cual se puede identificar por las bandas blancas o patrones de escamas en sus patas y tórax.

El *Aedes aegypti* se alimenta primordialmente durante el día y pica principalmente por la mañana o en las últimas horas de la tarde en áreas cubiertas. (Laue *et al*, 1999)

El ciclo de transmisión del virus del dengue por *Aedes aegypti* comienza con una persona infectada, quien tendrá el virus circulando en la sangre, una viremia que dura aproximadamente cinco días. Durante el período virémico, un mosquito *Aedes aegypti* hembra pica a la persona e ingiere sangre que contiene el virus del dengue. (World Health Organization, 2002), este se replica en el epitelio intestinal, ganglios nerviosos, cuerpo graso y glándulas salivales del mosquito. (Gubler, 1998)

El virus entra a la célula por endocitosis y se replica durante un período de **incubación extrínseca** dentro del mosquito (Ludolfs *et al*, 2002; Ortega, 2001), en donde el RNA genómico sirve directamente como mensajero, éste contiene un fragmento de lectura grande de mas de 10 Kb y es trasladado completamente desde su extremo 5' para producir una poliproteína grande precursora la cual luego es dividida para generar las proteínas virales individuales. El ensamble del virión ocurre en las células vertebradas sobre la membrana del retículo endoplasmático y en las células del mosquito en la

membrana plasmática, Una vez se forma totalmente el virión dentro del retículo endoplasmático, este es liberado vía lisis de la célula, este proceso dura de ocho a doce días, a continuación, el mosquito pica a una persona susceptible y transmite el virus también a ésta, así como a cualquier otra persona susceptible que el mosquito pique durante el resto de su vida. (Murray *et al*, 2003)

El virus se replica en la segunda persona y produce síntomas. Los síntomas aparecen en un promedio de cuatro a siete días después de la picadura de mosquito, éste es el período de **incubación intrínseca**, dentro de los seres humanos. (Ludolfs *et al*, 2002; Ortega, 2001).

El período de incubación intrínseca generalmente es de cuatro a siete días, pero puede llegar a durar hasta 14 días (Paban *et al*, 2006). La viremia comienza algo antes de la aparición de los síntomas y la enfermedad persiste durante varios días después de haber concluido la viremia (World Health Organization, 2002).

.La infección del hombre por un serotipo produce inmunidad de por vida para el serotipo homólogo, pero solo confiere inmunidad parcial y protección temporal contra infecciones subsecuentes producidas por los otros tres serotipos; es por esto que una segunda infección o múltiples infecciones con varios serotipos de dengue constituyen un factor de riesgo para que se produzcan las formas más graves de la fiebre del dengue, que son el dengue hemorrágico y el síndrome de shock por dengue. (Clarke, 2002; Vaughan *et al*, 2002; Yun Shu y Hsiung Huang, 2004)

1.4.1.3 Genética del virus del dengue

En 1906, Ashburh y Craig identificaron por primera vez al virus dengue como el agente etiológico de la fiebre dengue (Rodríguez y Marzal, 2004), es el arbovirus más prevalente en las regiones tropicales y subtropicales de Asia, África, América del Sur y América Central. (Yun Shu *et al*, 2003)

Los virus del dengue pertenecen al género Flavivirus de la familia Flaviviridae la cual contiene aproximadamente 70 tipos de virus. Los flavivirus son relativamente pequeños, de 40 – 50 nm. Su genoma está compuesto por una sola molécula de ARN (ácido ribonucleico) de cadena sencilla lineal, de sentido positivo y de alta variabilidad genómica (Yun Shu y Hsiung Huang, 2004), consta de cerca de 11000 bases de longitud (Gubler, 1998; Kung Wang *et al*, 2002) y codifica para una poliproteína simple, que sufre sucesivos cortes para generar proteínas virales individuales. 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 poliproteína (Yabar *et al*, 1999; Yun Shu *et al*, 2003)

El grupo virus Dengue esta representado por 4 serotipos: Virus Dengue 1 (DEN-1), Virus Dengue 2 (DEN-2), Virus Dengue 3 (DEN-3) y Virus Dengue 4 (DEN-4); los cuales exhiben características antigénicas y serológicas diferentes y además pueden presentar variantes genéticas (genotipos y topotipos) dentro de un mismo serotipo (Gubler, 1998; Liang Kao *et al*, 2005; Kung Wang *et al*, 2000; Yun Shu *et al*, 2003)

Las presentaciones clínicas de los 4 serotipos del dengue son similares, después de un período de incubación, hay fiebre y una variedad de síntomas evidenciándose la aparición del virus en la sangre (Liang Kao *et al*, 2005).

1.4.1.4 Diagnóstico convencional del dengue

Las infecciones por el virus del dengue pueden ser asintomáticas o pueden ocasionar fiebre indiferenciada. (Matheus *et al*, 2007); es por esto que en el diagnostico clínico, el dengue puede confundirse con: influenza, sarampión, rubéola, malaria, fiebre tifoidea, sepsis bacteriana y otras fiebres hemorrágicas virales (Johnson *et al*, 2005).

Para obtener un diagnóstico indiscutible de la infección de dengue, se requiere la confirmación del laboratorio (Gubler, 1998) ya sea por método directo,

aislamiento del virus, o indirecto, realizando la detección de anticuerpos específicos; el método dependerá del momento de la enfermedad, es decir si el paciente se encuentra en la fase aguda o en la fase de convalecencia (Yun Shu y Hsiung Huang, 2004). Se utilizan rutinariamente 5 pruebas serológicas para el diagnóstico de esta infección, estas pruebas son:

- Hemaglutinación – Inhibición (HI)
- Fijación del complemento (FC)
- Test de Neutralización (NT)
- MAC-ELISA
- IgG-ELISA
- Inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales
- Aislamiento del virus

El diagnóstico serológico del virus del dengue muchas veces resulta tedioso y complicado por la existencia de reactividad cruzada compartida por los determinantes antigénicos de los 4 serotipos de este virus y por otros miembros de la familia flaviviridae (Gubler, 1998; Lanciotti *et al*,1992; Liang Kao *et al*, 2005). A esto se suma que en estas pruebas se requiere un período de siete días para obtención de resultados confiables, lo cual limita su aplicación en el diagnóstico rápido (Yun Shu *et al*, 2003)

1.4.1.5 Diagnóstico molecular del dengue mediante RT-PCR

El diagnóstico temprano de infección por virus del dengue posibilita el inicio de tratamiento rápido y específico, disminuyendo con ello las tasas de morbi-mortalidad y complicaciones, especialmente en casos de dengue hemorrágico. Adicionalmente, provee de una herramienta para el mapeo epidemiológico de la infección, posibilitando el monitoreo continuo de los diversos serotipos del virus y la diseminación de ellos. Estas técnicas son de crítica utilidad para el control epidemiológico de la enfermedad.

Las pruebas serológicas usadas como “gold standard”, incluyendo el aislamiento viral muchas veces requieren de un tiempo prolongado de ejecución o bien presentan dificultades metodológicas, por lo cual una alternativa en la actualidad son las técnicas de diagnóstico rápido basadas en la biología molecular. (Yun Shu y Hsiung Huang, 2004).

.La RT-PCR es una herramienta muy útil debido a su alta sensibilidad, especificidad, el corto período de tiempo requerido para el diagnóstico y además ofrece la ventaja de identificar y detectar los cuatro serotipos de virus de dengue mediante el análisis de los tamaños únicos de amplicones en un gel de agarosa (Domingo et al, 2004; Liang Kao et al, 2005; Yun Shu y Hsiung Huang, 2004),

La detección y cuantificación de este virus en el plasma no solo es crucial para el diagnóstico rápido, sino que también la identificación del virus causante del dengue en la fase aguda de la enfermedad permite dar tratamiento clínico adecuado, mejorar la investigación de esta etiología y entender la forma de patogénesis del dengue (Kung Wang *et al*, 2000)

1.4.2 Nueva tecnología diagnóstica

El avance en las técnicas de manipulación del material genético y el conocimiento cada vez más profundo del genoma humano nos conducen inexorablemente a un nuevo concepto de la Medicina de tipo personalizado, en el que el diagnóstico molecular desempeñará un papel central.

El diagnóstico de laboratorio es importante para proporcionar el tratamiento adecuado y a tiempo al paciente, razón por la cual las técnicas moleculares cumplen un rol importante en el diagnóstico del dengue durante los primeros estadios de la enfermedad (Domingo et al, 2004).

1.4.2.1 Identificación de Dengue virus mediante la amplificación de ácidos nucleicos

El diagnóstico molecular es una herramienta de detección más rápida y sensible que el diagnóstico tradicional. Se basa en la amplificación del ácido nucleico del virus, aún si este se encuentra en estado de inactividad (Liang Kao *et al*, 2005).

El desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha permitido la aparición de un gran número de técnicas de diagnóstico para identificación de virus, incluyendo aquellas para detección del virus del dengue. La RT-PCR (Transcripción Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa) es un método rápido y de alta precisión que puede detectar el virus de dengue en muestras biológicas en humanos, por lo que puede ser usado para diagnóstico y para estudios epidemiológicos (Lanciotti *et al*, 1992).

La RT-PCR permite la amplificación de una cantidad pequeña de moléculas diana de RNA con gran especificidad, mediante la transcripción reversa del RNA a cDNA, el cual es posteriormente amplificado (Dieffenbach y Dveksler, 2003).

1.4.2.1.1 Tecnología RT-PCR

RT-PCR es un método enzimático de síntesis *in vitro* de múltiples copias en forma de DNA de una secuencia específica de RNA. La RT-PCR es una variante de la PCR en donde primero se realiza una transcripción reversa a partir de RNA para sintetizar el DNA complementario (cDNA) que luego es amplificado mediante una PCR convencional (Becker, 2002).

De esta forma se puede medir la expresión génica mediante una técnica alternativa al Northern blot o Dot Blot, ensayos de protección de RNasa, hibridación *in situ* y ensayos de nucleasa. La RT-PCR es más sensible que estas técnicas y requiere menos cantidad de muestra (Lizcano, 2004).

En esta reacción es muy importante evitar la presencia de RNA o DNA contaminante, tanto en las muestras como en el laboratorio y reactivos, debe

ser evitada con el fin de impedir la aparición de productos inespecíficos (Luque y Herraéz, 2001).

Hay dos partes diferenciadas en cualquier RT-PCR: la transcripción reversa y la [amplificación](#).

1.4.2.1.1.1 Transcripción reversa (RT)

La transcripción reversa, tanto utilizando RNA total como mRNA, es la etapa clave en una RT-PCR. Existen varios factores que influyen la eficiencia del proceso, tales como la procesividad de la enzima que cataliza la reacción, la presencia de estructuras secundarias en el RNA, etc. (Becker, 2002; Winter, 2005).

Como la RT-PCR depende de la síntesis de RNA a cDNA, la conversión máxima es de fundamental importancia para el desarrollo de este método.

Muchas transcriptasas reversas están disponibles para la síntesis de cDNA entre las que se puede mencionar: enzima de virus de leucemia murina de Moloney RT (MMLV), enzima de virus de mieloblastosis aviar RT (AMV), 2 RNasas H-mutantes de MMLV RT, todas estas son comercialmente distribuidas como SuperScript y SuperScript II y han sido usadas exitosamente en las pruebas de PCR (Dieffenbach y Dveksler, 2003).

Las reverso transcriptasas virales, tales como MMLV y AMV, han sido las enzimas de elección durante muchos años. Estas enzimas, sin embargo, son termolábiles y no pueden llevar a cabo la transcripción reversa cuando existen estructuras secundarias en el RNA. En este caso, se suelen utilizar transcriptasas reversas termoestables, que pueden llevar a cabo la reacción a 55-70°C, permitiendo la desnaturalización de las estructuras secundarias y aumentando la eficiencia global de la reacción.

La mayoría de los ensayos de RT son llevados a cabo en 2 pasos, primero se realiza la transcripción y luego una alícuota de la reacción de RT es usada para la PCR, estos dos pasos pueden contaminar la reacción debido a la

manipulación y al pipeteo extra con lo que se puede provocar variación en los resultados (Dieffenbach y Dveksler, 2003).

El método de RT-PCR en un solo paso permite llevar a cabo el proceso completo en un único paso, sin necesidad de cambiar de enzima del paso de transcripción reversa al de amplificación, para esto se requiere usar [RETROTOOLS cDNA/DNA polimerasa](#) (Winter, 2005).

La capacidad de la RETROTOOLS cDNA/DNA polimerasa para retrotranscribir y amplificar se logra mediante la incubación con diferentes buffers (RT buffer para la transcripción reversa y DNA buffer para la amplificación). En presencia de iones Mn^{2+} , RETROTOOLS posee actividad transcriptasa reversa, mientras que en presencia de iones Mg^{2+} , la actividad es polimerasa. El cambio de una actividad a otra se logra mediante la adición de agentes quelantes (incluidos en el DNA buffer) una vez que la transcripción reversa ha tenido lugar.

1.4.2.1.1.1 Elementos esenciales de RT-PCR

Primers

Los primers utilizados en RT-PCR están a ambos lados de un intrón. La selección del primer depende del tamaño del RNA molde. En la mayoría de los casos, se utilizan primers específicos de secuencia. Para análisis de mRNAs, pueden utilizarse primers oligo (dT), que se unen a las colas de poli(A) presentes en los mRNAs eucarióticos.

La concentración de los primers suele estar alrededor de 50 pmol / 50 μ l volumen final reacción, aunque esta concentración puede variar y debe ser optimizada (Surzycki, 1999).

RNA molde

El RNA molde debe estar puro e íntegro. Debe comprobarse la ausencia de actividades DNasa y RNasa, así como de contaminaciones de DNA y/o RNA exógenos.

Se puede comprobar la integridad del RNA en geles de agarosa desnaturalizantes. Deben observarse claramente las bandas correspondientes a rRNA (18-16S y 28-23S), con una mancha difusa entre ellas, que corresponde al mRNA. Si aparecen manchas por debajo de la banda 18-16S, significa que parte del mRNA está degradado y por tanto podría ser inútil para el análisis posterior. Además, es necesario comprobar que no quedan restos del proceso de purificación (fenol, NaCl, tiocianato de guanidina), que inhiben fuertemente la actividad enzimática (McPherson, 1991).

Deben calcularse, asimismo, las cantidades de RNA molde añadidas a la reacción, ya que un exceso puede provocar inespecificidad e incluso inhibición de la reacción. En general, es suficiente con 10 pg a 1 µg (Surzycki, 1999),

1.4.2.1.1.2 PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), herramienta imprescindible en el laboratorio de biología molecular e ingeniería genética, es una técnica de síntesis de DNA *in vitro*, es decir, su objetivo es la amplificación directa de un gen o fragmento de DNA o indirecta de un RNA (a partir de su DNA complementario o cDNA) (Dieffenbach y Dveksler, 2003; Luque y Herraiez, 2001; Surzycki, 1999). Una secuencia de longitud definida puede ser sintetizada a partir de una pequeña cantidad de moléculas diana (Surzycki, 1999).

La PCR constituye un procedimiento rápido, sensible y de bajo costo que permite amplificar DNA de interés específico (McPherson *et al*, 1991), en cantidad suficiente para un análisis detallado o para su manipulación (Winter, 2005).

Las aplicaciones de la PCR son muy variadas y se pueden mencionar: clonación acelular de fragmentos de DNA, detección de secuencias sin purificación previa, secuenciación de ácidos nucleicos, establecimiento de polimorfismos de secuencia, rastreo de mutaciones, diagnóstico de enfermedades genéticas, determinación de secuencias específicas de DNA

relacionadas con patologías definidas, resolución de problemas forenses o arqueológicos, estudios evolutivos, detección de microorganismos infecciosos, detección de células tumorales, entre otras (Luque y Herraéz, 2001).

1.4.2.1.1.2.1 Componentes de la PCR

Los reactivos o componentes de una PCR son los siguientes:

DNA polimerasa termoestable: La taq polimerasa es la enzima termoestable más comúnmente usada y se llama así por proceder de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive en manantiales de agua caliente. Sin embargo, en la actualidad existe una variedad de polimerasas termoestables que han sido aisladas de bacterias termofílicas o hipertermofílicas. (Surzycki, 1999; Luque y Herraéz, 2001)

La concentración de la enzima afecta la calidad del producto en la reacción, excesiva cantidad de enzima puede producir productos no específicos; por lo que se coloca de 1 a 5 unidades por reacción de PCR.

El rol de la DNA polimerasa en la PCR es copiar la molécula de DNA. La enzima se une a la hebra sencilla de DNA y sintetiza una nueva cadena complementaria. Para empezar a actuar, la polimerasa necesita una pequeña región de doble cadena, esto se logra a través de los primers que se unen a cada lado de la secuencia de DNA a ser amplificada (Surzycki, 1999).

DNA blanco o target DNA: Contiene la secuencia a ser amplificada, la reacción de PCR puede ser llevada a cabo con pequeñas cantidades de DNA incluso si éste es relativamente impuro. La concentración de DNA usada generalmente es de 0.1 – 10 ng (Surzycki, 2005).

Primers: Un set eficiente de primers debe hibridar exclusivamente a la secuencia blanco y no a otras secuencias. Los primers deben tener entre 20-25 bases de longitud. En general se debe procurar que los 2 primers tengan un

contenido GC similar al de la secuencia blanco (40 – 60% de contenido GC es adecuado para la mayoría de reacciones).

La concentración de primers requerida para una reacción de PCR varía entre 0,2 – 1 uM. El exceso de primers puede producir la formación de “primer-dimers”

dNTP: Los desoxirribonucleótidos (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) o sustrato de la reacción no deben exceder los 200 uM. Los cuatro dNTPs deben ser usados en concentraciones iguales, lo que ayudará a disminuir el rango de error de la enzima. El exceso de dNTPs inhibe la acción enzimática y contribuye a la aparición de falsos productos

MgCl₂: El ión Mg actúa como cofactor para todas las DNA polimerasas y además la concentración de este componente puede afectar la hibridación de los primers, la especificidad de los productos, la formación de primer-dimers. La concentración usada generalmente es de 2 – 4 mM.

Buffer: El tris HCl debe estar entre 10 – 50 mM y su pH se mantendrá entre 8 y 9 para que trabajen adecuadamente la mayoría de polimerasas termofílicas.

Sales: Se usa el sodio o potasio para facilitar la correcta hibridación de los primers. La concentración correcta cuando se trabaja con taq polimerasa es de 50 mM

1.4.2.1.1.2 Principio del método PCR

La PCR permite la amplificación enzimática de una secuencia de DNA blanco (target DNA), a través de varios ciclos de síntesis de DNA (Winter, 2005). Durante la reacción, los productos de un ciclo sirven como plantilla para la síntesis de DNA en el siguiente ciclo (Surzycki, 1999), como resultado, se obtiene una acumulación exponencial de producto durante los primeros ciclos.

Cada ciclo de la síntesis de DNA está compuesto de tres fases: denaturación, elongación o annealing y extensión (Figura 1.1). Aunque muchos protocolos incluyen una fase de denaturación inicial antes de que empiece el cicleamiento; este paso se añade para asegurar la completa denaturación del DNA blanco

El proceso se lleva a cabo en aproximadamente 20 – 40 ciclos dependiendo de la cantidad de secuencia blanco en la plantilla de DNA. Toda la reacción se realiza mediante el uso de un termociclador (Persing, 2003).

Denaturación: A una temperatura de entre 90°C - 96°C, la doble hélice se desestabiliza y las moléculas de DNA se separan en cadenas simples capaces de ser copiadas por la DNA polimerasa (Winter, 2005).

Annealing: La temperatura de la reacción disminuye (45 °C - 65 °C) hasta permitir que los primers se unan específicamente a la hebra de DNA. La temperatura de la reacción depende de la secuencia y del número de bases de los primers.

Extensión: Este proceso se lleva a cabo a la temperatura a la cual la DNA polimerasa es más activa (72°C para la taq polimerasa). La polimerasa, dirigida por la posición de los primers copia la secuencia blanco a partir de la cadena sencilla de DNA.

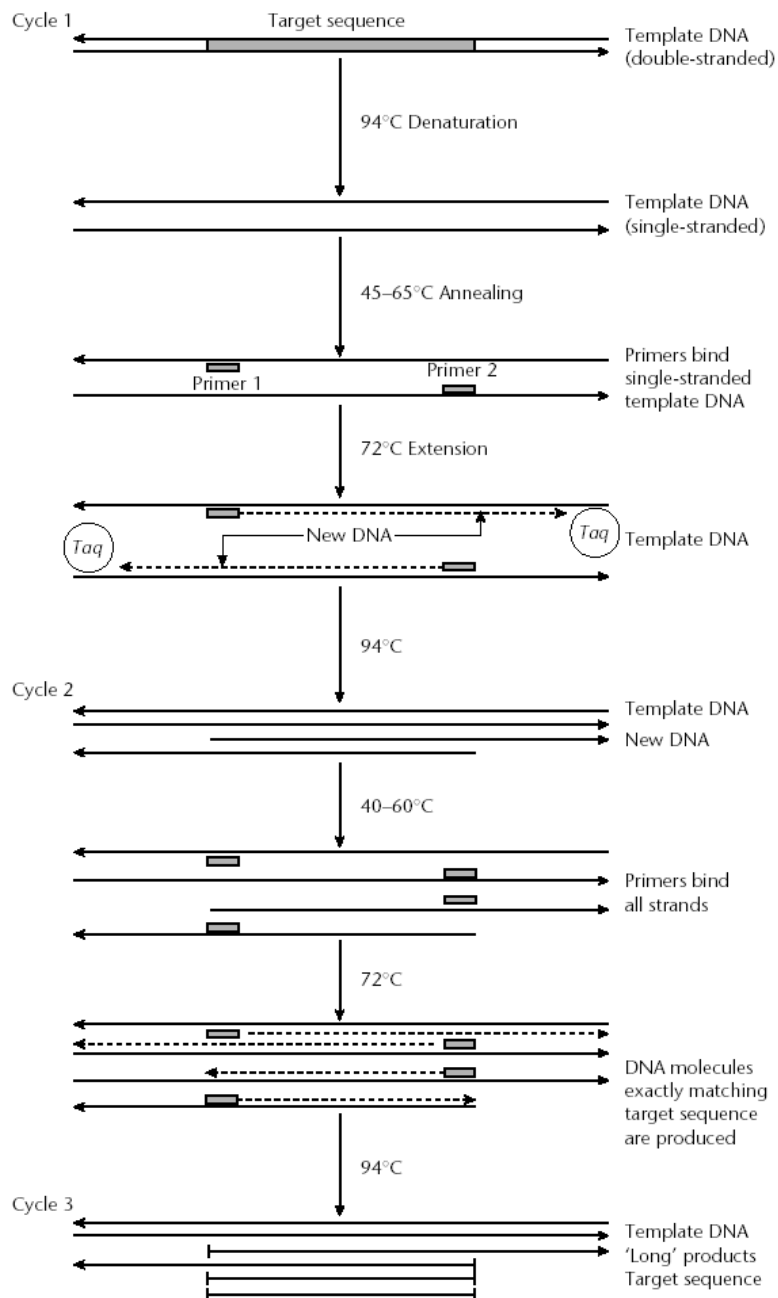


Figura 1.1 Esquema del proceso de amplificación de DNA el cual involucra ciclos repetidos de incubación a temperaturas diferentes. Inicialmente la reacción se calienta a 94 °C para la denaturación. El siguiente paso (45 - 65 °C) permite que los oligonucléotidos se unan a la secuencia target. En el tercer paso a 72 °C la taq polimerasa comienza a sintetizar una cadena de DNA complementaria.

Tomado de: <http://www.espanol.pclinks.com/variantes/rtpcr.htm>

1.4.2.1.1.2.3 Optimización de la PCR

Elementos aumentadores, varios aditivos tales como el dimetilsulfóxido (DMSO), polietilenglicol (PEG), glicerol, detergentes no iónicos, formamida y suero de albúmina bovina se pueden incorporar a la reacción para incrementar la especificidad de la reacción.

Temperatura de annealing, la optimización de esta temperatura comienza con el cálculo de los valores de la temperatura de melting T_m , definida como la temperatura a la cual el 50% del DNA esta denaturado. La fórmula más simple es $T_m = 4(G+C) + 2(A + T)$, en donde, G corresponde a guanidina, C a citosina, A adenina y T, timina. Esta ecuación es usada para primers de hasta 21 bases de longitud (Dieffenbach y Dveksler, 2003).

Fórmulas más complejas pueden ser usadas, pero en la práctica la T_m es afectada por los componentes individuales del buffer, por lo que cualquier T_m calculada puede ser considerada como una aproximación.

La temperatura de annealing (T_a), indica la temperatura de mayor rendimiento para el par de primers usados para la amplificación de la secuencia blanco. Esta temperatura es de 2 - 6°C menos que la temperatura de melting.

Número de ciclos, el aumento de los ciclos puede fortalecer una reacción, pero esta modificación puede dar como resultado la formación de fragmentos inespecíficos y smears, compuestos de productos de alto peso molecular.

Controles, aún cuando se usen los mejores reactivos, primers y demás componentes, se deben construir controles adecuados para controlar la presencia de contaminación en la reacción. Necesariamente deben existir controles negativos, y un control positivo, para evaluar la eficiencia del ensayo. Los controles se corren en las mismas condiciones que las reacciones de PCR y el control negativo debe tener todos los reactivos excepto DNA

1.5 Sistema de hipótesis o pregunta de investigación

La técnica de RT-PCR (Transcripción reversa – Reacción en cadena de la polimerasa), permite desarrollar un sistema de identificación específico, sensible, rápido y preciso de género y serotipo específico de virus de dengue, a partir de RNA obtenido de cultivos virales.

CAPITULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

Este estudio se desarrolló gracias al apoyo financiero del Vicerrectorado de Investigaciones de la Escuela Superior Politécnica del Ejército.

El Instituto Nacional de Higiene y enfermedades tropicales “Leopoldo Izquieta Pérez” de la ciudad de Guayaquil colaboró con los cultivos puros de virus dengue utilizados a lo largo del proyecto.

2.2 Zona de estudio

El Proyecto fue realizado en su totalidad en la Escuela Politécnica del Ejército, Laboratorio de Biotecnología Humana.

El Laboratorio, está ubicado en Sangolquí, en el campus principal de la ESPE.

2.3 Período de tiempo de investigación

El trabajo experimental se inició el 15 de Abril del 2006 y fue terminado el 30 de Noviembre del 2007

2.4 Diseño

Investigación de tipo experimental, se utilizaron técnicas de análisis cuantitativo tipo análisis logístico para la determinación del límite de detección del método.

2.5 Procedimiento

2.5.1 Pruebas preliminares con DNA humano

Se realizó un ensayo preliminar para verificar el funcionamiento tanto del kit de extracción de RNA como el kit de RT-PCR, para ello se amplificaron fragmentos de los genes que codifican para factor II y factor V de coagulación humanos y que están asociados a trombofilia (Angeleni *et al*, 2002). El método en el cual nos basamos fue el previamente descrito por este autor

2.5.1.1 Extracción de RNA de sangre

Se tomaron muestras de sangre en tubos con EDTA de 5 ml y se procedió a la extracción de ARN de sangre total a partir del kit QIAamp RNA Mini Kit. El protocolo se describe a continuación:

1. Extraer sangre en un tubo con EDTA.
2. Mezclar 1 volumen de sangre total en 5 volúmenes de Buffer EL en un tubo Eppendorf de tamaño apropiado
3. Incubar durante 15 min a -20°C, durante la incubación mezclar (vortex) 2 veces
4. Centrifugar a 2200 RPM a 4°C durante 10 min, descartar todo el sobrenadante
5. Agregar el buffer EL al pellet obtenido para resuspenderlo mezclar mediante vortex (2 volúmenes de buffer por volumen de sangre total)
6. Centrifugar a 2200 RPM a 4°C durante 10 min, descartar todo el sobrenadante
7. Añadir 350 ul de buffer RTL y mezclar con vortex.
8. La mezcla obtenida colocarla cuidadosamente en la columna QIAshredder, centrifugar 2 min. a máxima velocidad para homogenizar. Descartar la columna y guardar el producto homogenizado
9. Añadir 350 ul de etanol 70% y mezclar con la micropipeta.
10. Colocar la muestra dentro de de la columna QIAamp, centrifugar a 10 000 RPM por 15 seg. Descartar el tubo
11. Transferir la columna a un tubo de 2ml y colocar 700 ul de buffer RW1 (buffer de lavado) en la columna QIAamp y centrifugar a 10 000 RPM, por 15 seg. Descartar el tubo

12. Colocar la columna en un nuevo tubo de 2 ml, añadir el buffer RPE y centrifugar a 10 000 RPM, por 15seg. Descartar el tubo
13. Colocar la columna dentro de un nuevo tubo de 2ml y añadir 500 ul de buffer RPE, centrifugar a 14 000 RPM durante 3 min. Descartar el tubo.
14. Colocar la columna en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y agregar 30 ul de agua libre de RNasas; centrifugar a 10 000 RPM por 1 min. Descartar la columna
15. Almacenar el RNA a -20°C

2.5.1.2 Cuantificación de las muestras obtenidas

Las muestras de RNA obtenidas se visualizaron en un gel de agarosa al 0.8%, para comprobar la existencia de material de buena calidad para la amplificación.

Para la carga de las muestras en el gel se tomaron 5 ul del RNA obtenido y se mezcló con 2 ul de loading buffer 10x (Invitrogen). En este ensayo no fue necesario el uso de marcador de peso molecular debido a que solo se necesita verificar la existencia de RNA

La corrida electroforética se realizó en gel de agarosa al 0,8% en TAE 1X, a 120 V durante 2 horas.

2.5.1.2.1 Cuantificación mediante fluorometría

El fluorómetro (QubitTM Fluorometer) permite que la cuantificación de RNA sea fácil y precisa, el kit provee los elementos necesarios tales como: fluoróforo, buffer de dilución y muestras de RNA standard; el ensayo es selectivo para RNA e incluso para dsDNA y es efectivo para muestras con concentraciones desde 250 pg/ul hasta 100 ng/ul.

El protocolo para la cuantificación de RNA (Quant It RNA assay kit) se describe a continuación:

1. Elegir el número apropiado de tubos de 0.5 ml incluyendo 2 tubos para los standards.
2. Elaborar la solución de trabajo, diluyendo el reactivo Quant iT RNA 1:200 en el Quant iT RNA buffer. Tomar en cuenta que el volumen final en cada uno de los tubos debe ser de 200 ul.
3. Para las soluciones standard, colocar 190 ul de la solución de trabajo y 10 ul de cada standard, mezclar en el vortex de 2 – 3 seg.
4. Cargar la solución de trabajo en tubos individuales (de acuerdo al número de muestras que se desee cuantificar) y añadir las muestras de RNA. El volumen final debe ser 200 ul. Mezclar en el vortex de 2 – 3 seg.
5. Incubar todos los tubos durante dos minutos a temperatura ambiente.
6. Colocar las muestras standard en el Qubit para la calibración del equipo.
7. Insertar las muestras de RNA en el fluorómetro y realizar las mediciones.

2.5.1.3 Ensayo RT-PCR para factores de coagulación

La RT-PCR aquí desarrollada fue adaptada a partir del ensayo de Angeleni *et al*, 2002.

Se utilizaron primers para el factor II y factor V de coagulación, cuyas secuencias son las siguientes:

Factor II:	Primer sense	5´ TCT AGA AAC AGT TGC CTG GC 3´
	Primer antisense	5´ CAC TGG GAG CAT TGA GGA TC 3´
Factor V:	Primer sense	5´ TGT TAT CAC ACT GGT GCT TAA 3´
	Primer antisense	5´ CAG ATC CCT GGA CAG ACG 3´

El kit para la RT-PCR usado fue SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) , el cual está diseñado para la detección y el análisis de moléculas de RNA mediante RT-PCR de forma reproducible y muy sensible. Mediante este método “en un solo paso” se puede desarrollar la síntesis de RNA a cDNA y la amplificación por PCR en un solo tubo usando los primers específicos y el RNA blanco. El sistema usa una mezcla de transcriptasa reversa SuperScript III y DNA polimerasa Platinum Taq en un buffer de reacción optimizado; con esto es posible detectar un amplio rango de RNAs blanco de 200 bp hasta 4.5 kb. La cantidad de material inicial puede variar entre 0.01 pg – 1 ug de RNA total. (Invitrogen: SuperScript. III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase, 2003)

La transcriptasa reversa SuperScript III es una versión de la MMLV RT construida para reducir la actividad RNasa y dar estabilidad térmica, esta enzima puede sintetizar cDNA a temperaturas entre 45°C – 60°C y provee gran especificidad y altos índices de síntesis de cDNA. (Invitrogen: SuperScript. III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase, 2003)

La DNA polimerasa es una Taq DNA polimerasa recombinante con anticuerpos adecuados para inhibir la actividad polimerasa a temperatura ambiente, pero su actividad se restaura después del paso de denaturación en la PCR a 94°C. El mix de reacción (2X reaction mix) contiene un buffer apropiado, Mg²⁺, dNTPs y estabilizadores.

Para el ensayo con factores de coagulación se ensambló la master mix con 3 reacciones para factor II y 3 reacciones para factor V, para cada factor se usa un control negativo.

La preparación del master mix para los factores II y V se detalla en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1 Volúmenes de los reactivos usados para la preparación del master mix, se señala el volumen requerido para una reacción (1X) y para las reacciones necesarias para este ensayo, 3 reacciones (3X). El volumen final de la reacción sin DNA es de 45 ul.

Reactivo	Volumen (ul)	
	1X	3X
2X Reaction Mix	25	75
Primer sense FII	0.3	0.9
Primer antisense FII	0.3	0.9
Taq	2	6
H ₂ O PCR	17.4	52.2
TOTAL	45	

El volumen por reacción fue 45 ul, a los que se añadió 5 ul de RNA, excepto al control negativo, el cual en lugar de RNA, tenía 5 ul de agua grado PCR. El volumen final de cada reacción fue 50 ul. Las muestras fueron llevadas al termociclador, para el proceso de amplificación mediante los ciclos descritos en la Tabla 2.2

Tabla 2.2 Programa de RT-PCR usado en el termociclador para la amplificación de las muestras correspondientes a factores de coagulación II y V.

# Ciclos	Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	Síntesis de cDNA	55	30 min
1	Denaturación inicial	94	2 min
	Denaturación	94	15 seg
40	Annealing	55	30 seg
	Extensión	68	1 min
1	Extensión final	68	5 min
	Final hold	4	

2.5.2 Pruebas a partir de cultivo viral de dengue

El análisis previo con RNA humano, sirvió para verificar el adecuado funcionamiento de los kits. Los ensayos con RNA viral, obtenido de cultivos del virus proporcionados por el Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Izquieta Pérez” iniciaron con la optimización del proceso de extracción de RNA viral.

2.5.2.1 Obtención del material genético del virus de dengue

Para el proceso de RT-PCR es de suma importancia obtener material genético de buena calidad, por lo cual fue necesario optimizar el método de extracción de RNA a partir de cultivos virales de dengue serotipo 3 inoculado en línea celular continua C6/36, por medio de columnas de extracción de RNA con la ayuda del kit QIAamp RNA Mini Kit.

Los tres protocolos de extracción usados fueron modificados a partir del original que viene junto con el kit.

2.5.2.2 Protocolo optimizado de extracción de RNA viral

A continuación se muestra el protocolo de extracción que fue utilizado a lo largo del presente trabajo, los otros dos protocolos probados se detallan en el Anexo A.

Protocolo optimizado

La extracción se realizó usando dos viales de 1.5 ml, cada uno de los cuales contenía 100 ul de muestra inicial. Se utilizaron controles negativos. Este protocolo aumenta la velocidad y el tiempo de centrifugación para obtener un mejor pellet viral

1. Colocar 100 ul del cultivo en un vial de 1.5 ml y centrifugar a 10 000 RPM durante 10 minutos
2. Descartar el sobrenadante
3. Colocar 600 ul de buffer RTL para resuspender el pellet.
4. Pipetear el lisado directamente dentro de la columna QIAshredder y centrifugar durante 2 min a máxima velocidad Descartar la columna y conservar el tubo que contiene el líquido.
5. La mezcla obtenida colocarla cuidadosamente en la columna y guardar el producto homogenizado
6. Añadir 700 ul de etanol 70% y mezclar con la micropipeta.
7. Colocar la muestra dentro de de la columna QIAamp, centrifugar a 10000 RPM por 15 s. Descartar el tubo
8. Transferir la columna a un tubo de 2ml y colocar 700 ul de buffer RW1 (buffer de lavado) en la columna QIAamp y centrifugar a 10 000 RPM, por 15 seg.. Descartar el tubo
9. Poner la columna en un nuevo tubo de 2 ml y pipetear dentro de ella el buffer RPE y centrifugar a 10 000 RPM por 15s. Descartar el tubo
10. Colocar la columna dentro de un nuevo tubo de 2ml y añadir 500 ul de buffer RPE, centrifugar a 14 000 RPM durante 3 min. Descartar el tubo.
11. Colocar la columna en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y agregar 30 – 50 ul de agua libre de RNasas; centrifugar a 10 000 RPM por 1 min. Descartar la columna
12. Almacenar el RNA obtenido a -80°C

2.5.2.3 Cuantificación de las muestras de RNA

Las muestras de RNA se cargaron en gel de agarosa al 0.8%, se colocó 5 ul de RNA con 2 ul de loading buffer 10X, la electroforesis se realizó en TAE 1X durante 2 horas a 120 V. No se usó marcador de peso molecular.

2.5.2.3.1 Cuantificación mediante fluorometría

El protocolo para la cuantificación de RNA (Quant It RNA assay kit) se describe a continuación:

1. Elegir el número apropiado de tubos de 0.5 ml incluyendo 2 tubos para los standards.
2. Elaborar la solución de trabajo, diluyendo el reactivo Quant iT RNA 1:200 en el Quant iT RNA buffer. Tomar en cuenta que el volumen final en cada uno de los tubos debe ser de 200 ul.
3. Para las soluciones standard, colocar 190 ul de la solución de trabajo y 10 ul de cada Standard, mezclar en el vortex de 2 – 3 seg.
4. Cargar la solución de trabajo en tubos individuales (de acuerdo al número de muestras que se desee cuantificar) y añadir las muestras de RNA. El volumen final debe ser 200 ul. Mezclar en el vortex de 2 – 3 seg.
5. Incubar todos los tubos durante dos minutos.
6. Colocar las muestras standard en el Qubit fluorometer para la calibración del equipo.
7. Insertar las muestras de RNA en el fluorómetro y realizar las mediciones.

La cantidad de RNA presente se calcula mediante la fórmula:

$$C = Qf \cdot \frac{200}{x}$$

En donde,

C= concentración de RNA en el tubo de muestra en ng/ml

Qf= lectura dada por el fluorómetro

x= cantidad en microlitros de la muestra adicionada al tubo

Todas las muestras obtenidas en los diferentes protocolos fueron sometidas a electroforesis horizontal en geles de agarosa al 0.8% y fueron cuantificadas a través del fluorómetro.

2.5.3 Pruebas de RT-PCR para la amplificación de dengue virus

Se probaron dos metodologías de RT-PCR (Lanciotti *et al*, 1992; Yun Shu *et al*, 2003)

Las pruebas se realizaron con dengue serotipo 3, cultivo que nos fue proporcionado. Previamente los oligonucleótidos a utilizarse fueron diluidos a una concentración final de 100 pmol/ul

2.5.3.1 Ensayos con Método 1 (Yun Shu *et al*, 2003) para dengue virus

Los protocolos que fueron usados en esta sección para el ensamblaje de la master mix y para la programación en el termociclador estuvieron basados en los métodos descritos en el artículo de Yun Shu *et al*, 2003. Se realizan ensayos para la identificación del virus de dengue y par el serotipo 3 del virus.

Los primers utilizados en este ensayo son: DN-F y DN-R para grupo específico, DN-F – D1-R para serotipo 1, DN-F – D2-R para serotipo 2, DN-F – D3-R para serotipo 3, DN-F – D4-R para serotipo 4

Tabla 2.3 Primers utilizados en el ensayo de RT-PCR (Método 1), se detalla el nombre de los pares de primers usados para la amplificación de las secuencias respectivas ya sea género o serotipo específico de dengue, así como también el tamaño en pares de bases de los productos obtenidos (Yun Shu *et al*, 2003)

Primer	Secuencia		Tamaño producto (bp)
DN-F	5'CAA TAT GCT GAA ACG CGA GAG AAA 3'	Dengue virus	171
DN-R	5'CCC CAT CTA TTC AGA ATC CCT GCT 3'		
DN-F	5'CAA TAT GCT GAA ACG CGA GAG AAA 3'	Dengue virus Serotipo 1	193
D1-R	5' CGC TCC ATA CAT CTT GAA TGA G 3'		

DN-F	5' CAA TAT GCT GAA ACG CGA GAG AAA 3'	Dengue virus Serotipo 2	204
D2-R	5' AAG ACA TTG ATG GCT TTT GA 3'		
DN-F	5' CAA TAT GCT GAA ACG CGA GAG AAA 3'	Dengue virus Serotipo 3	204
D3-R	5' AAG ACG TAA ATA GCC CCC GAC 3'		
DN-F	5' CAA TAT GCT GAA ACG CGA GAG AAA 3'	Dengue virus Serotipo 4	132
D4-R	5' AGG ACT CGC AAA AAC GTG ATG AAT 3'		

2.5.3.1.1 Amplificación de dengue género específico

La RT-PCR para la identificación de género de virus de dengue se hizo con los primers DN-F y DN-R.

Se ensambló primero el master mix para seis reacciones con los siguientes componentes: 2X reaction mix, Super Script III RT Platinum Taq mix, primers, agua grado PCR, como se detalla a continuación:

Tabla 2.4 Volúmenes de los reactivos usados para la preparación del master mix, se señala el volumen requerido para una reacción (1X) y para las reacciones necesarias para este ensayo, 6 reacciones (6X). El volumen final de la reacción sin DNA es de 45 ul.

Reactivo	Volumen (ul)	
	1X	6X
2X Reaction Mix	25	150
Primer DN-F	0.3	1.8
Primer DN-R	0.3	1.8

Taq	2	12
H ₂ O PCR	17.4	104.4
TOTAL	45	

El volumen por reacción fue 45 ul, se añadió 5 ul de RNA, excepto al control negativo, el que en lugar de RNA, tenía 5 ul de agua grado PCR. Por tanto el volumen final de cada reacción fue 50 ul

Las muestras fueron llevadas al termociclador, para el proceso de amplificación mediante los ciclos descritos en la Tabla 2.5

Tabla 2.5 Programa de RT-PCR usado en el termociclador para la amplificación de las muestras de dengue virus género específico.

# Ciclos	Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	Síntesis de cDNA	45	30 min
1	Denaturación inicial	94	2 min
	Denaturación	95	20 seg
35	Annealing	55	30 seg
	Extensión	72	30 seg
1	Extensión final	68	5 min
	Final hold	4	

2.5.3.1.2 Amplificación de dengue serotipo específico

La RT-PCR se llevó a cabo con los primers DN-F y D3-R, que permitieron la amplificación del fragmento específico para el serotipo 3.

Se ensambló el master mix para seis reacciones con los siguientes componentes: 2X reaction mix, Super Script III RT Platinum Taq mix, primers, agua grado PCR, como se detalla a continuación:

Tabla 2.6 Volúmenes de los reactivos usados para la preparación del master mix, se señala el volumen requerido para una reacción (1X) y para las reacciones necesarias para este ensayo, 6 reacciones (6X). El volumen final de la reacción sin RNA es de 45 ul.

Reactivo	Volumen (ul)	
	1X	6X
2X Reaction Mix	25	150
Primer DN-F	0.3	1.8
Primer D3-R	0.3	1.8
Taq	2	12
H ₂ O PCR	17.4	104.4
TOTAL	45	

El volumen final por reacción fue de 45 ul, se añadió 5 ul de RNA, excepto al control negativo, el que en lugar de RNA, tenía 5 ul de agua grado PCR. Por tanto el volumen final cada reacción fue 50 ul

Las muestras fueron llevadas al termociclador, para el proceso de amplificación mediante los ciclos que se mencionan en la Tabla 2.7

Tabla 2.7 Programa de RT-PCR usado en el termociclador para la amplificación de las muestras correspondientes a dengue virus, serotipo 3.

# Ciclos	Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	Síntesis de cDNA	55	30 min
1	Denaturación inicial	94	2 min
	Denaturación	94	15 seg
35	Annealing	55	30 seg
	Extensión	68	1 min
1	Extensión final	68	5 min
	Final hold	4	

Una vez finalizado el proceso en el termociclador, las muestras se colocaron en un gel de agarosa al 2%, en TAE 1X a 120 V, durante 45 minutos. En el gel se colocaron 10 ul de muestra con 3 ul de loading buffer, se usó un marcador de peso molecular de 100 bp

2.5.3.2 Ensayos con Método 2 (Lanciotti *et al*, 1992) para dengue virus

Los protocolos que fueron usados en esta sección tanto para el ensamblaje de la master mix como para el proceso de cicleamiento en el termociclador, estuvieron basados en el método descrito por Lanciotti *et al*, 1992. Se realizaron ensayos para género y para serotipo 3 de virus de dengue.

Los primers utilizados en este ensayo fueron D1 y D2 para grupo o género específico, D1 – TS1, para serotipo 1, D1 – TS2 para serotipo 2, D1 – TS3 para serotipo 3, D1 – TS4 para serotipo 4

2.5.3.2.1 Amplificación de dengue género específico

Para la obtención del fragmento específico que permitió la identificación del virus de dengue, se utilizaron los primers D1 y D2 en la RT-PCR

Se ensambló el master mix para seis reacciones con los siguientes componentes: 2X reaction mix, Super Script III RT Platinum Taq mix, primers, agua grado PCR, como se detalla a continuación:

Tabla 2.8 Volúmenes de los reactivos usados para la preparación del master mix, se señala el volumen requerido para una reacción (1X) y para las reacciones necesarias para este ensayo, 6 reacciones (6X). El volumen final de la reacción sin RNA es de 45 ul.

Reactivo	Volumen (ul)	
	1X	6X
2X Reaction Mix	25	150
Primer D1	0.3	1.8
Primer D2	0.3	1.8
Taq	2	12
H ₂ O PCR	17.4	104.4
TOTAL	45	

El volumen por reacción fue 45 ul, se añadió 5 ul de RNA, excepto al control negativo, el que en lugar de RNA, tenía 5 ul de agua grado PCR. Por tanto el volumen final de cada reacción fue 50 ul. Las muestras fueron llevadas al termociclador, para el proceso de amplificación mediante los ciclos indicados en la Tabla 2.9

Tabla 2.9 Programa de RT-PCR usado en el termociclador para la amplificación de las muestras de dengue género específico

# Ciclos	Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo
----------	---------	------------------	--------

1	Síntesis de cDNA	42	1 hora
1	Denaturación inicial	95	2 min
	Denaturación	94	30 seg
35	Annealing	55	1 min
	Extensión	72	2 min
1	Extensión final	72	4 min
	Final hold	4	

2.5.3.2.2 Amplificación de dengue serotipo específico

El ensayo fue realizado para identificar el serotipo 3 del virus de dengue, por lo tanto los primers utilizados fueron D1 y TS3.

Se ensambló el master mix para seis reacciones, con los siguientes componentes: 2X reaction mix, Super Script III RT Platinum Taq mix, primers, agua grado PCR, como se detalla a continuación

Tabla 2.10 Volúmenes de los reactivos usados para la preparación del master mix, se señala el volumen requerido para una reacción (1X) y para las reacciones necesarias para este ensayo, 6 reacciones (6X). El volumen final de la reacción sin RNA es de 45 ul.

Reactivo	Volumen (ul)	
	1X	6X
2X Reaction Mix	25	150
Primer D1	0.3	1.8
Primer TS3	0.3	1.8
Taq	2	12
H ₂ O PCR	17.4	104.4
TOTAL	45	

El volumen por reacción fue 45 ul, se añadió 5 ul de RNA, excepto al control negativo, el que en lugar de RNA, tenía 5 ul de agua grado PCR. Por tanto el volumen final de cada reacción fue 50 ul.

Las muestras se llevaron al termociclador, para el proceso de RT-PCR mediante los ciclos indicados en la Tabla 2.11

Tabla 2.11 Programa de RT-PCR usado en el termociclador para la amplificación de las muestras de RNA de dengue, serotipo 3

# Ciclos	Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	Síntesis de cDNA	42	1 hora
1	Denaturación inicial	94	2 min
	Denaturación	94	30 seg
40	Annealing	55	1 min
	Extensión	72	2 min
1	Extensión final	72	4 min
	Final hold	4	

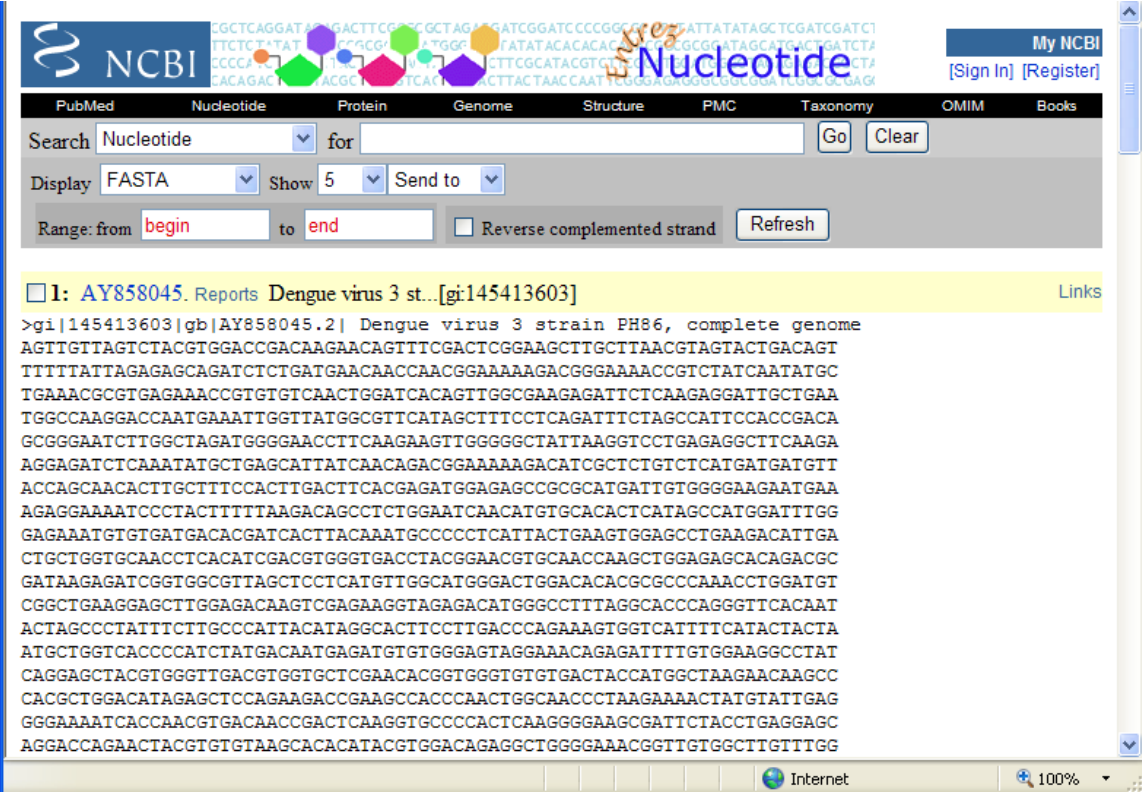
Las muestras fueron colocadas en un gel de agarosa al 2% con TAE 1X, en donde se puso 10 ul del producto obtenido con 3 ul de loading buffer y 7 ul del marcador de peso molecular low DNA mass ladder.

Los mejores resultados se obtuvieron con el **Método 2 (Lanciotti et al, 1992)**, por tanto la optimización de la técnica de RT-PCR se realizó a partir de esta metodología.

2.5.4 Análisis de secuencias de dengue virus

Las secuencias de los virus dengue se obtuvieron de la base de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information), un recurso computacional muy útil para análisis de genomas de diferentes organismos.

Esta herramienta nos permite obtener de manera sencilla el genoma completo de los virus dengue con lo que posteriormente se puede realizar el análisis de secuencias y primers.



The screenshot displays the NCBI Nucleotide search interface. At the top, there is a navigation bar with the NCBI logo and the word "Nucleotide" in a large, stylized font. Below the navigation bar, there are search options for "Nucleotide", "Protein", "Genome", "Structure", "PMC", "Taxonomy", "OMIM", and "Books". The search bar contains the text "Search Nucleotide for" and a "Go" button. Below the search bar, there are options for "Display FASTA", "Show 5", and "Send to". There is also a "Range: from begin to end" field and a "Reverse complemented strand" checkbox. The search results section shows a single entry: "1: AY858045. Reports Dengue virus 3 st...[gi:145413603]". Below this entry, the complete genome sequence is displayed in FASTA format, starting with ">gi|145413603|gb|AY858045.2| Dengue virus 3 strain PH86, complete genome". The sequence is a long string of nucleotide characters (A, T, C, G) arranged in lines.

Figura 2.1 Secuencia de dengue virus tipo 3, se observa la pantalla de NCBI que proporciona la secuencia en formato FASTA, y toda la información del genoma.

Obtenido de www.ncbi.nlm.nih.gov

2.5.4.1 Primers para la amplificación de género y serotipo específico de dengue

El amplicón específico de virus de dengue, ya sea éste de género o serotipo específico, se obtuvo al usar diferentes pares de primers, con lo que se visualizó un tamaño de fragmento único, estos primers se los detalla en la Tabla 2.11

Tabla 2.11 Primers utilizados en el ensayo de RT-PCR (Método 2), se detalla el nombre de los pares de primers usados para la amplificación de las secuencias respectivas ya sea género o serotipo específico de dengue, así como también el tamaño en pares de bases de los productos obtenidos (Lanciotti , 1992)

Primer	Secuencia		Tamaño producto (bp)
D1	5'-TCAATATGCTGAAACGCGCGA GAAACCG-3'	Dengue virus	511
D2	5'-TTGCACCAACAGTCAATGTCT TCAGGTTC-3'		
D1	5'-TCAATATGCTGAAACGCGCGA GAAACCG-3'	Dengue virus Serotipo 1	482
TS1	5'-CGTCTCAGTGATCCGGGGG-3'		
D1	5'-TCAATATGCTGAAACGCGCGA GAAACCG-3'	Dengue virus Serotipo 2	119
TS2	5'-CGCCACAAGGGCCATGAACAG-3'		
D1	5'-TCAATATGCTGAAACGCGCGA GAAACCG-3'	Dengue virus Serotipo 3	290
TS3	5'-TAACATCATCATGAGACAGAGC-3'		
D1	5'-TCAATATGCTGAAACGCGCGA GAAACCG-3'	Dengue virus	392

TS4	5'-CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA-3'	Serotipo 4	
-----	------------------------------	------------	--

2.5.4.2 Secuencias de dengue virus con hibridación de los primers específicos

Los primers de los que se realizó el análisis que se presenta a continuación, fueron obtenidos del artículo de Lanciotti (Método 2), por lo tanto lo que se hizo en esta sección fue identificar la posición de los primers en la secuencia para comprobarla

Se muestran las secuencias de los primers forward y reverse y su posición de hibridación en el segmento de amplificación. En azul se indica el primer forward y el reverse, las secuencias mostradas en rojo corresponden a la ubicación del primer respectivo en la secuencia de amplificación. Las bases señaladas con color turquesa representan las bases que difieren con el primer. Se señala también la posición del primer relativa al gen.

Género

134

161

TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG

⇒ Primer forward D1

TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCGCGTGTCAACTGTTTCACAGTTG
 GCGAAGAGATTCTCAAAGGATTGCTTTCAGGCCAAGGACCCATGAAATTG
 GTGATGGCTTTTATAGCATTCTAAGATTTCTAGCCATACCTCCAACAGCA
 GGAATTTTGGCTAGATGGGGCTCATTCAAGAAGAATGGAGCGATCAAAGT
 GTTACGGGGTTTCAAGAAAGAAATCTCAAACATGTTGAACATAATGAACAG
 GAGGAAAAGATCTGTGACCATGCTCCTCATGCTGCTGCCACAGCCCTGG
 CGTTCCATCTGACCACCCGAGGGGGAGAGCCGCACATGATAGTTAGCAAG
 CAGGAAAGAGGAAAATCACTTTTGTTTAAGACCTCTGCAGGTGTCAACATG
 TGCACCCTTATTGCAATGGATTTGGGAGAGTTATGTGAGGACACAATGACC
 TACAAATGCCCCCGGATCACTGAGACG
 GAACCAAGATGACGTTGACTGTTGGTGCAA

TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTTC

⇒ Primer reverse D2

Serotipos

Dengue virus serotipo 1:

El mismo análisis se realizó para la secuencia de virus serotipo 1 (EU081263.1)

134 161
TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG ⇒ Primer forward D1
 TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCGCGTGTCAACTGTTTCACAGTTG
 GCGAAGAGATTCTCAAAGGATTGCTCTCAGGCCAAGGACCCATGAAACT
 GGTGATGGCTTTCATAGCATTCTAAGATTTCTAGCCATACCCCCAACAGC
 AGGAATTTTGGCTAGATGGGGCTCATTCAAGAAGAATGGAGCGATCAAAT
 GCTACGGGGTTTCAAGAAAGAAATCTCAAACATGTTGAATATAATGAATAG
 AAGGAAAAGATCTGTGACCATGCTCCTTATGCTGATGCCTACAGCCTTAGC
 GTTCCATTTGACTACACGAGGGGGAGAGCCGCACATGATAGTCAGCAAGC
 AGGAAAGAGGAAAGTCACTTTTGTAAAGACCTCAGCAGGTGTTAACATGT
 GCACCCTTATAGCGATGGATTTGGGAGAGTTATGTGAGGACACAATGACTT
 ACAAATGCCCTCGAATCACTGAGGCG

Primer reverse TS1 ⇐ CGTCTCAGTGATCCGGGGG
 568 586

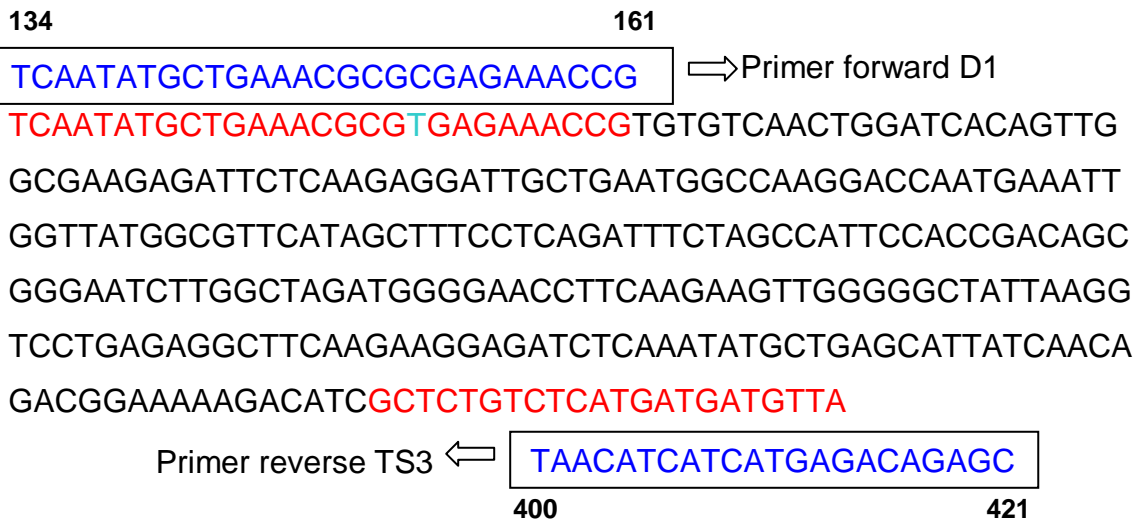
Dengue virus serotipo 2:

El analisis para dengue virus serotipo 2 (AY858035.2) es el siguiente:

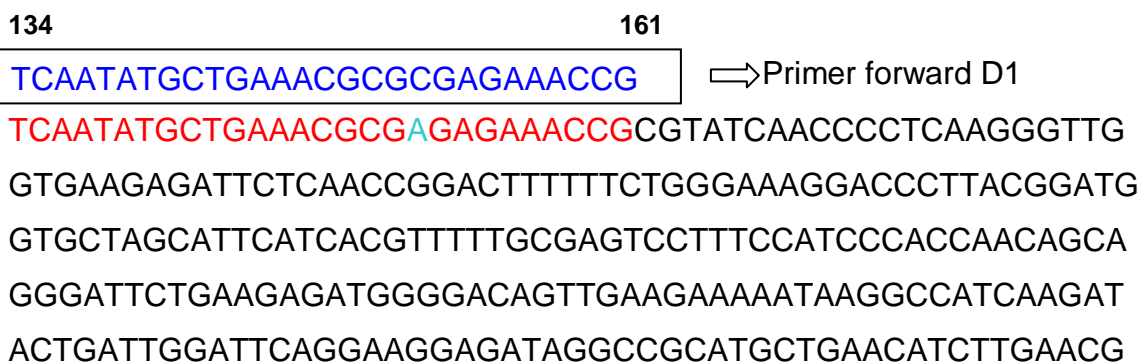
134 161
TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG ⇒ Primer forward D1
 TCAATATGCTGAAACGCGAGAGAAACCGCGTGTCAACTGTGCAGCAGCTG
 ACAAAGAGATTCTCACTTGGAAATGCTACAGGGACGAGGACCATTGAAACT
 GTTCATGGCCCTGGTGGCA
CGCCACAAGGGCCATGAACAG ⇒ Primer reverse TS2

Dengue virus serotipo 3:

Para dengue virus serotipo 3 (AY858045.2), el análisis es el siguiente:



Dengue virus serotipo 4:



Primer reverse TS4 \leftarrow

CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA

GGAGAAAAAGGTCAACGATAACATTGCTGTGCTTGATTCCCACCGTAATGG
CGTTTTCCCTCAGCACAAGAGATGGCGAACCCCTCATGATAGTGGCAAAA
CATGAAAGGGGGAGACCTCTCTTGTTTAAGACAACAGAG

506

527

2.5.5 Estandarización del método RT-PCR para la detección de dengue virus

Las variables elegidas para la optimización fueron: temperatura de annealing y denaturación inicial.

2.5.5.1 Dengue virus género específico

Las pruebas de optimización se realizaron primero para género específico, y la primera variable con la que se trabajó es con la temperatura de hibridación o annealing de los primers.

2.5.5.1.1 Temperatura de annealing

Se realizó el cálculo de la temperatura de melting a través de la siguiente fórmula:

$$T_m = 64.9 + \frac{41((G + C) - 16.4)}{N}$$

En donde,

T_m= temperatura de melting

G+C= cantidad de guaninas y citosinas en el primer

N= numero total de pares de bases en el primer

Nombre Primer	Nº bp	Secuencia	Temperatura Melting (°C)
D1	28	5' TCA ATA TGC TGA AAC GCG CGA GAA ACC G 3'	61.3
D2	29	5' TTG CAC CAA CAG TCA ATG TCT TCA GGT TC 3'	60.0
TS1	19	5' CGT CTC AGT GAT CCG GGG G 3'	57.5
TS2	21	5' CGC CAC AAG GGC CAT GAA CAG 3'	58.2
TS3	22	5' TAA CAT CAT CAT GAG ACA GAG C 3'	51.1
TS4	22	5' CTC TGT TGT CTT AAA CAA GAG A 3'	49.2

Tabla 2.13 Temperaturas de melting calculadas para cada uno de los primers usados para la identificación de virus de dengue, se indica el nombre del primer, su número de pares de bases, la secuencia y la temperatura de melting correspondiente

El análisis detallado del cálculo de las temperaturas de melting y annealing de los primers de la Tabla 2.13 se encuentra en el Anexo B

Se procedió con el ensayo que permitió encontrar la temperatura de annealing óptima para los primers pertenecientes a género y serotipo específico.

De acuerdo con las temperaturas calculadas se trabajó con un rango comprendido entre 55°C - 61°C.

Se ensambló el master mix para nueve reacciones, con los componentes y cantidades detalladas en la Tabla 2.14

Tabla 2.14 Volúmenes de los reactivos usados para la preparación del master mix, se señala el volumen requerido para una reacción (1X) y para las reacciones necesarias para este ensayo, 9 reacciones (9X). El volumen final de la reacción sin RNA es de 45 ul. Los primers usados son para género específico

Reactivo	Volumen (ul)	
	1X	9X
2X Reaction Mix	25	225
Primer D1	0.3	2.7
Primer D2	0.3	2.7
Taq	2	18
H ₂ O PCR	17.4	156.6
TOTAL	45	

El volumen final por reacción fue 45 ul, se añadió 5 ul de RNA, excepto al control negativo, el que en lugar de RNA, tenía 5 ul de agua grado PCR. Por tanto el volumen final de cada reacción fue 50 ul

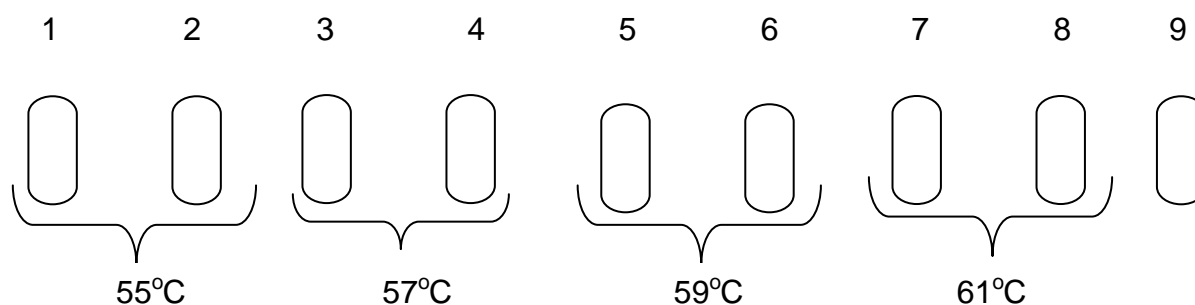


Figura 2.2 Representación de los viales PCR que contienen el master mix, en donde se indica la dupleta y la temperatura a la que se efectuó el proceso de annealing. Los tubos 1-8 contenían master mix más RNA. El tubo 9 fue el control negativo.

Las muestras fueron llevadas al termociclador, para el proceso de amplificación mediante los ciclos de la Tabla 2.15

Tabla 2.15 Programa de RT-PCR usado en el termociclador para la amplificación de las muestras de RNA de dengue

# Ciclos	Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	Síntesis de cDNA	45	45 min
1	Denaturación inicial	94	2 min
	Denaturación	94	30 seg
40	Annealing	55, 57, 59, 61	45 seg
	Extensión	72	1 min
1	Extensión final	72	4 min
	Final hold	4	

Este ensayo se hizo dos veces, debido a que los fragmentos de amplificación obtenidos no fueron consistentes, por esta razón se realizó una nueva extracción de RNA y se ejecutó otra vez el proceso señalado en las Tablas 2.14 y 2.15.

Después de la repetición del proceso, la temperatura de annealing a la que se obtuvieron mejores resultados fue 57°C, por lo que esta fue la temperatura de trabajo elegida.

2.5.5.1.2 Denaturación inicial

Otra variable de optimización usada fue la denaturación después de la síntesis de cDNA. En todas las reacciones hechas anteriormente se incluyó denaturación inicial; las reacciones que se muestran a continuación se llevaron a cabo sin este proceso.

Fue necesario comparar la efectividad del proceso, por lo que se hicieron reacciones en pares ensambladas bajo las mismas condiciones, pero en

diferentes termocicladores, ya que en la mitad de las reacciones se aplicó denaturación después del proceso de síntesis de cDNA y en la otra mitad, este proceso fue omitido.

El ensamblaje de la master mix se realizó de igual forma que en las reacciones anteriores, se usaron seis reacciones, de las cuales dos son usadas como control negativo.

Tabla 2.16 Volúmenes de los reactivos usados para la preparación del master mix, se señala el volumen requerido para una reacción (1X) y para las reacciones necesarias para este ensayo, 6 reacciones (6X). El volumen final de la reacción sin RNA es de 45 ul. Los primers usados son para género específico

Reactivo	Volumen (ul)	
	1X	6X
2X Reaction Mix	25	150
Primer D1	0.3	1.8
Primer D2	0.3	1.8
Taq	2	12
H ₂ O PCR	17.4	104.4
TOTAL	45	

El volumen por reacción fue 45 ul, se añadió 5 ul de RNA, excepto al control negativo, el que en lugar de RNA, tenía 5 ul de agua grado PCR. Por tanto el volumen final de cada reacción fue 50 ul.

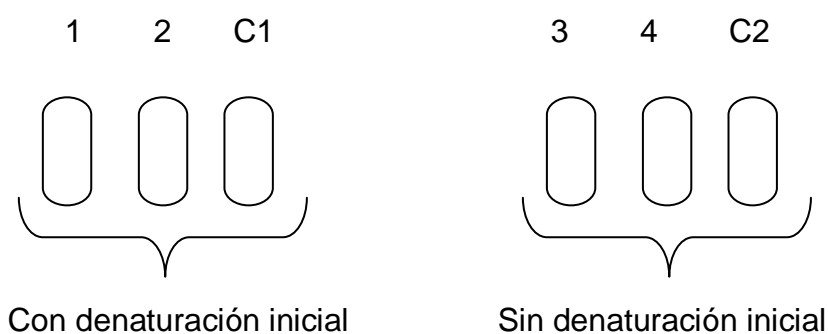


Figura 2.3 Representación de los viales PCR que contienen el master mix, en donde se indica las 3 reacciones que fueron sometidas a denaturación inicial y las 3 reacciones en las que no

se aplicó este proceso. Los tubos 1-2, 3-4 contenían master mix más RNA. Los tubos C1 y C2 fueron usados como control negativo.

Las muestras fueron llevadas al termociclador en donde se siguieron los ciclos de las Tablas 2.17 y 2.18

Tabla 2.17 Programa de RT-PCR usado en el termociclador para la amplificación de las muestras de RNA de dengue, se incluye el paso de denaturación inicial.

# Ciclos	Proceso	T (°C)	Tiempo
1	Síntesis de cDNA	45	45 min
1	Denaturación inicial	94	2 min
35	Denaturación	94	30 seg
	Annealing	57	45 seg
	Extensión	72	1 min
1	Extensión final	72	4 min
	Final hold	4	

Tabla 2.18 Programa de RT-PCR usado en el termociclador para la amplificación de RNA de dengue. No se incluye denaturación inicial

# Ciclos	Proceso	T (°C)	Tiempo
1	Síntesis de cDNA	45	45 min
35	Denaturación	94	30 seg
	Annealing	57	45 seg
	Extensión	72	1 min
1	Extensión final	72	4 min
	Final hold	4	

Para género específico, se consiguieron mejores resultados al seguir el proceso de la Tabla 2.18

2.5.5.2 Dengue virus serotipo específico

2.5.5.2.1 Denaturación inicial

Para los ensayos de serotipo específico no se usó denaturación después del proceso de síntesis de cDNA, debido a los buenos resultados obtenidos en las pruebas con dengue virus género específico. A partir de este punto, en todas las reacciones se omitió este proceso.

2.5.5.2.2 Temperatura de annealing

Es importante encontrar la temperatura óptima de trabajo para serotipo específico, por lo que se probaron temperaturas de annealing en un rango de 53°C – 57°C. Se ensambló la master mix para 7 reacciones como se detalla en la Tabla 2.19

Tabla 2.19 Volúmenes de los reactivos usados para la preparación del master mix, se señala el volumen requerido para una reacción (1X) y para las reacciones necesarias para este ensayo, 7 reacciones (7X). El volumen final de la reacción sin RNA es de 45 ul. Los primers usados son para serotipo específico

Reactivo	Volumen (ul)	
	1X	7X
2X Reaction Mix	25	175
Primer D1	0.3	2.1
Primer TS3	0.3	2.1
Taq	2	14
H ₂ O PCR	17.4	121.8
TOTAL	45	

El volumen por reacción fue 45 ul, se añadió 5 ul de RNA, excepto al control negativo, el que en lugar de RNA, tenía 5 ul de agua grado PCR. Por tanto el volumen final de cada reacción fue 50 ul.

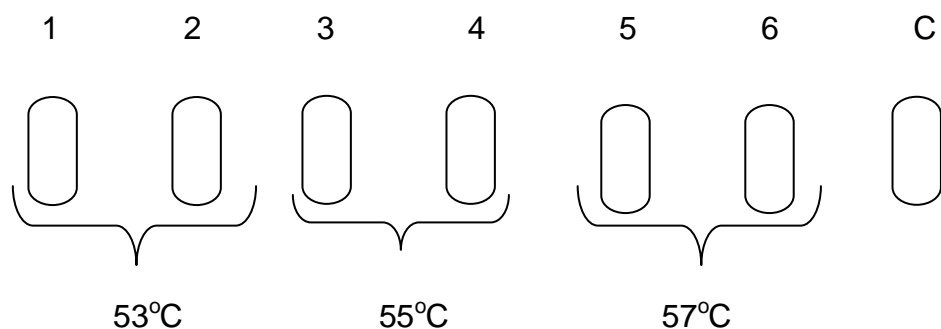


Figura 2.4 Representación de los viales PCR que contienen el master mix, en donde se indica la dupleta y la temperatura a la que se efectuó el proceso de annealing. Los tubos 1-6 contenían master mix más RNA. El tubo C fue el control negativo.

Las muestras fueron llevadas al termociclador mediante los ciclos detallados en la Tabla 2.20

Tabla 2.20 Programa de RT-PCR usado en el termociclador para la amplificación de las muestras de RNA de dengue

# Ciclos	Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	Síntesis de cDNA	45	45 min
	Denaturación	94	30 seg
35	Annealing	53, 55, 57	45 seg
	Extensión	72	1 min
1	Extensión final	72	4 min
	Final hold	4	

La temperatura de annealing a la que se obtuvieron mejores resultados fue 57°C.

2.5.6 Estandarización del volumen de reacción del método RT-PCR para la detección de dengue virus

En todas las reacciones hasta el momento fueron usados volúmenes finales de reacción de 50 ul, se buscó reducir lo máximo este volumen final, debido a los costos del kit, reactivos, y la cantidad de RNA usado por reacción (5 ul). Para esto se realizaron varios ensayos para obtener un amplicón de buena calidad con menor cantidad de master mix.

El volumen final por reacción fue reducido para género y serotipo específico de virus dengue

2.5.6.1 Género específico

Como primer paso se trató de reducir el volumen final de reacción de 50 ul a 20 ul. Los componentes usados para el ensamblaje de la master mix, fueron los mismos de los ensayos anteriores, pero se redujo la cantidad de 2X Reaction Mix y agua grado PCR, la cantidad de primers y Taq Polimerasa se mantuvo.

En la Tabla 2.21 se detallan los volúmenes usados en el ensamblaje de la master mix para 4 reacciones.

Tabla 2.21 Volúmenes de los reactivos usados para la preparación del master mix, se señala el volumen requerido para una reacción (1X) y para las reacciones necesarias para este ensayo, 4 reacciones (7X). El volumen final de la reacción sin RNA es de 20 ul. Los primers usados son para género específico

Reactivo	Volumen (ul)	
	1X	4X
2X Reaction Mix	12.5	50
Primer D1	0.3	1.2
Primer D2	0.3	1.2
Taq	2	8
H ₂ O PCR	4.9	19.6
TOTAL	20	

El volumen por reacción fue 20 ul, se añadió 5 ul de RNA, excepto al control negativo, el que en lugar de RNA, tenía 5 ul de agua grado PCR. Por tanto el volumen final de cada reacción fue 20 ul.

El proceso que se siguió en el termociclador, fue el detallado en la tabla 2.18. No se obtuvo amplificación, se presumió que este resultado se dio por degradación del RNA con el que se trabajó.

Se realizó un nuevo proceso de extracción de RNA y se comprobó la integridad del RNA extraído mediante la ejecución de una RT-PCR con las condiciones optimizadas para un volumen de reacción de 50 ul. Una vez probado el RNA, se retomó el ensayo de volúmenes de reacción.

Como primer paso se ensamblaron master mix para los siguientes volúmenes: 20 ul, 30 ul, 40 ul y 50 ul. El detalle de los componentes usados para cada master mix se encuentra en la Tabla 2.22

Tabla 2.22 Volúmenes de reactivos usados para el ensamblaje de master mix, se indica las cantidades usadas para una reacción (1X) y para 3 reacciones (3X) para los volúmenes finales de 20, 30, 40 y 50 ul. Se usan primers para género específico

Reactivo	Vol (ul)		Vol (ul)		Vol (ul)		Vol (ul)	
	1X	3X	1X	3X	1X	3X	1X	3X
2X Rxn Mix	10	30	15	45	20	60	25	75
Primer D1	0.3	0.9	0.3	0.9	0.3	0.9	0.3	0.9
Primer D2	0.3	0.9	0.3	0.9	0.3	0.9	0.3	0.9
Taq	2	6	2	6	2	6	2	6
H2O PCR	5.4	16.2	9.4	28.2	13.4	40.2	17.4	52.2
TOTAL	18		27		36		45	

El volumen de las reacciones sin RNA fue 18, 27, 36 y 45 ul, a los viales usados como control positivo se les agregó 2, 3, 4 y 5 ul de RNA respectivamente. Los viales usados como control negativo tenían agua grado PCR en lugar de RNA

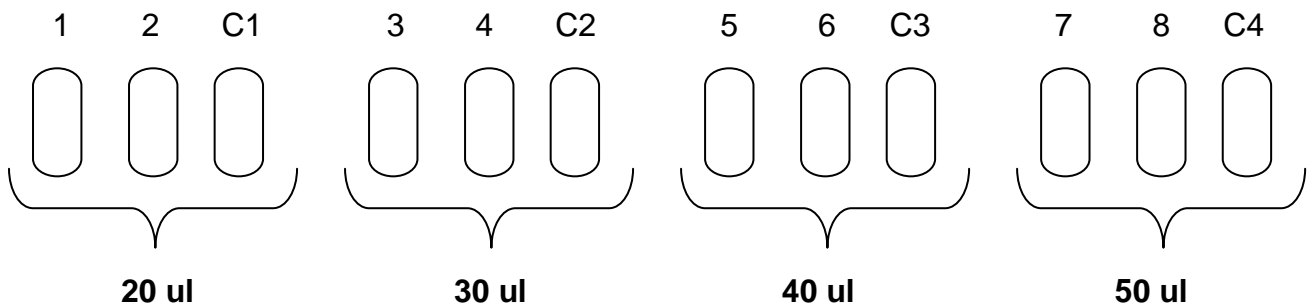


Figura 2.5 Representación de los viales PCR en donde se indica la dupleta y su control negativo, con el volumen de master mix (20 ul, 30 ul, 40 ul y 50 ul) respectivo para cada grupo de reacciones. Los tubos 1-2, 3-4, 5-6, 7-8, contenían master mix más RNA. Los tubos C1, C2, C3 y C4 fueron controles negativos

Las muestras fueron llevadas al termociclador mediante los ciclos descritos en la Tabla 2.23

Tabla 2.23 Programa de RT-PCR optimizado usado en el termociclador para la amplificación de las muestras de RNA de dengue

# Ciclos	Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	Síntesis de cDNA	45	45 min
	Denaturación	94	30 seg
35	Annealing	57	45 seg
	Extensión	72	1 min
1	Extensión final	72	4 min
	Final hold	4	

Se obtuvieron amplicones con todos los volúmenes probados en el ensayo anterior, por lo que se procedió a bajar más el volumen de reacción, el rango con el que se trabajó fue 10 ul, 15 ul y 20 ul.

En la siguiente Tabla se encuentran los componentes usados para el ensamblaje de las master mix con diferentes volúmenes

Tabla 2.24 Volúmenes de reactivos usados para el ensamblaje de master mix, se indica las cantidades usadas para una reacción (1X) y para 3 reacciones (3X) para los volúmenes finales de 10, 15 y 20 ul. Se usan primers para género específico

Reactivo	Vol (ul)		Vol (ul)		Vol (ul)	
	1X	3X	1X	3X	1X	3X
2X Rxn Mix	5	60	7.5	75	10	45
Primer D1	0.3	0.9	0.3	0.9	0.3	0.9
Primer D2	0.3	0.9	0.3	0.9	0.3	0.9
Taq	2	6	2	6	2	6
H2O PCR	1.4	4.2	3.4	10.2	5.4	16.2
TOTAL	9		13.5		18	

Las reacciones sin RNA tenían un volumen de 9, 13.5 y 18 ul, a las que se les colocó 1, 1.5 y 2 ul de RNA respectivamente. Se ensamblaron controles negativos que solo contienen agua grado PCR en lugar de RNA.

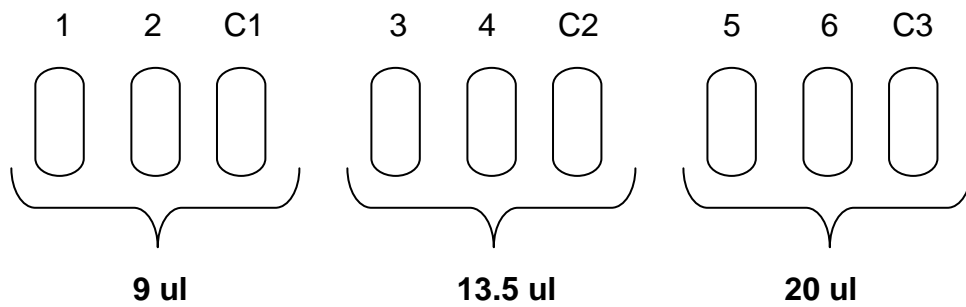


Figura 2.6 Representación de los viales PCR en donde se indica la dupleta y su control negativo, con el volumen de master mix (9 ul, 13.5 ul y 20 ul) respectivo para cada grupo de reacciones. Los tubos 1-2, 3-4, 5-6, contenían master mix más RNA. Los tubos C1, C2, C3 fueron controles negativos

Las muestras fueron llevadas al termociclador, y se siguió el proceso de la Tabla 2.23

Se obtuvo un buen amplicón al usar como volumen final de reacción 10 ul, pero para mejorar esta banda, se realizó un ensayo, en donde se probaron diferentes concentraciones de primers y de Taq polimerasa.

Se probaron concentraciones de primers de 10 pmol, 20 pmol y 30 pmol, y para cada una de estas concentraciones, el volumen de Taq polimerasa usado fue de 0,5 ul, 1 ul y 2 ul. Los detalles de los volúmenes usados se describen en las Tablas 2.25, 2.26 y 2.27

Tabla 2.25 Volúmenes de reactivos usados para el ensamblaje de la master mix, la concentración de primers para todos los casos es de 10 pmol, la Taq polimerasa es de 0.5 ul para la tabla 1, 1 ul para la tabla 2 y 2 ul para la tabla 3. El volumen final por reacción sin RNA es de 9 ul. Se usan primers de género específico.

1			2			3		
Reactivo	Vol (ul)		Reactivo	Vol (ul)		Reactivo	Vol (ul)	
	1X	3X		1X	3X		1X	3X
2X Rxn Mix	5	15	2X Rxn Mix	5	15	2X Rxn Mix	5	15
Primer D1	0.1	0.3	Primer D1	0.1	0.3	Primer D1	0.1	0.3
Primer D2	0.1	0.3	Primer D2	0.1	0.3	Primer D2	0.1	0.3
Taq	0.5	1.5	Taq	1	3	Taq	2	6
H2O PCR	3.3	9.9	H2O PCR	2.8	8.4	H2O PCR	1.8	5.4
TOTAL	9		TOTAL	9		TOTAL	9	

Tabla 2. 26 Volúmenes de reactivos usados para el ensamblaje de la master mix, la concentración de primers para todos los casos es de 20 pmol, la Taq polimerasa es de 0.5 ul para la tabla 1, 1 ul para la tabla 2 y 2 ul para la tabla 3. El volumen final por reacción sin RNA es de 9 ul. Se usan primers de género específico.

1			2			3		
Reactivo	Vol (ul)		Reactivo	Vol (ul)		Reactivo	Vol (ul)	
	1X	3X		1X	3X		1X	3X
2X Rxn Mix	5	15	2X Rxn Mix	5	15	2X Rxn Mix	5	15
Primer D1	0.2	0.6	Primer D1	0.2	0.6	Primer D1	0.2	0.6
Primer D2	0.2	0.6	Primer D2	0.2	0.6	Primer D2	0.2	0.6
Taq	0.5	1.5	Taq	1	3	Taq	2	6
H2O PCR	3.1	9.3	H2O PCR	2.6	7.8	H2O PCR	1.6	4.8
TOTAL	9		TOTAL	9		TOTAL	9	

Tabla 2. 27 Volúmenes de reactivos usados para el ensamblaje de la master mix, la concentración de primers para todos los casos es de 30 pmol, la Taq polimerasa es de 0.5 ul para la tabla 1, 1 ul para la tabla 2 y 2 ul para la tabla 3. El volumen final por reacción sin RNA es de 9 ul. Se usan primers de género específico.

1 2 3

Reactivo	Vol (ul)		Reactivo	Vol (ul)		Reactivo	Vol (ul)	
	1X	3X		1X	3X		1X	3X
2X Rxn Mix	5	15	2X Rxn Mix	5	15	2X Rxn Mix	5	15
Primer D1	0.3	0.9	Primer D1	0.3	0.9	Primer D1	0.3	0.9
Primer D2	0.3	0.9	Primer D2	0.3	0.9	Primer D2	0.3	0.9
Taq	0.5	1.5	Taq	1	3	Taq	2	6
H2O PCR	2.9	8.7	H2O PCR	2.4	7.2	H2O PCR	1.4	4.2
TOTAL	9		TOTAL	9		TOTAL	9	

Se agregó 1 ul de RNA a cada una de las reacciones descritas en las tablas anteriores, dos fueron usadas como control positivo y una como control negativo la cual tenía agua grado PCR en lugar de RNA. El volumen final de cada reacción fue 10 ul

El programa para el termociclador usado es el descrito en la Tabla 2.18

En base al ensayo anterior, los mejores resultados de RT-PCR se dieron al usar 0.5 ul de Taq y concentración de primers de 10 pmol. Pero se vio la necesidad de optimizar la temperatura de annealing, por tanto se ensambló un master mix para 9 reacciones, en donde se prueba con un rango de temperaturas de 55°C – 59°C.

En la siguiente Tabla se observa con detalle los volúmenes y componentes usados.

Tabla 2.28 Volúmenes de los reactivos usados para la preparación del master mix, se señala el volumen requerido para una reacción (1X) y para las reacciones necesarias para

este ensayo, 9 reacciones (9X). El volumen final de la reacción sin RNA es de 9 ul. Los primers usados son para género específico

Reactivo	Volumen (ul)	
	1X	9X
2X Reaction Mix	5	45
Primer D1	0.1	0.9
Primer D2	0.1	0.9
Taq	0.5	4.5
H ₂ O PCR	3.3	29.7
TOTAL	9	

El volumen por reacción fue 9 ul, se añadió 1 ul de RNA, excepto al control negativo, el que en lugar de RNA, tenía 1 ul de agua grado PCR. Por tanto el volumen final de cada reacción fue 10 ul.

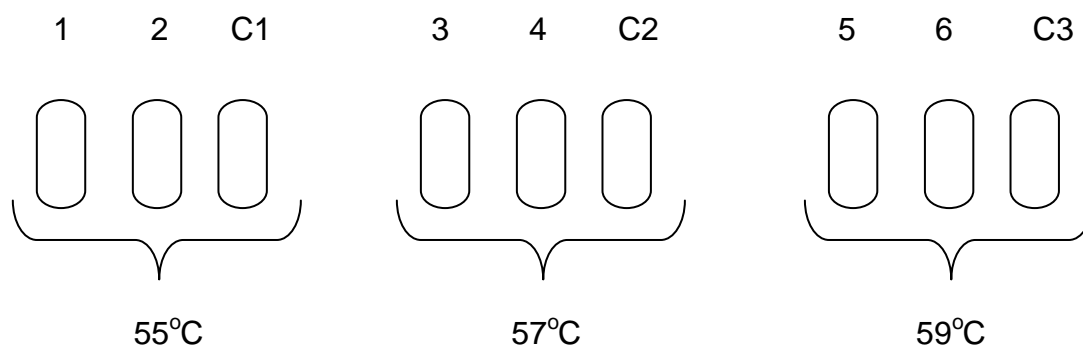


Figura 2.7 Representación de los viales PCR que contienen el master mix, en donde se indica la dupleta y la temperatura a la que se efectuó el proceso de annealing. Los tubos 1-2, 3-4, 5-6 contenían master mix más RNA. Los tubos C1, C2 y C3 fueron controles negativos.

En la Tabla 2.29 se describen los ciclos usados en el termociclador

Tabla 2.29 Programa de RT-PCR optimizado usado en el termociclador para la amplificación de las muestras de RNA de dengue

# Ciclos	Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo
----------	---------	------------------	--------

1	Síntesis de cDNA	45	45 min
	Denaturación	94	30 seg
35	Annealing	55, 57, 59	45 seg
	Extensión	72	1 min
1	Extensión final	72	4 min
	Final hold	4	

La mejor temperatura para un volumen de 10 ul fue 57°C, con lo que la reacción para género específico quedó optimizada.

2.5.6.2 Serotipo específico

Una vez optimizada la reacción con volumen final de 10 ul para género específico, se vio la necesidad de proceder a la optimización del volumen para la reacción de serotipo específico.

Se probaron las condiciones usadas para género específico por esta razón fue fundamental como primer paso, probar el adecuado funcionamiento del RNA y de la reacción optimizada para un volumen final de 50 ul y compararlo con la reacción con un volumen final de 10 ul. Este ensayo se realizó bajo condiciones de ensamblaje iguales.

En la tabla siguiente, se encuentran detallados los componentes y volúmenes usados para una reacción con un volumen final de 50 ul

Tabla 2.30 Volúmenes de los reactivos usados para la preparación del master mix, se señala el volumen requerido para una reacción (1X) y para las reacciones necesarias para este ensayo, 3 reacciones (3X). El volumen final de la reacción sin RNA es de 45 ul. Los primers usados son para serotipo específico. Reacción optimizada para 50 ul

Reactivo	Volumen (ul)	
	1X	3X
2X Reaction Mix	25	75
Primer D1	0.3	0.9
Primer TS3	0.3	0.9
Taq	2	6
H ₂ O PCR	17.4	52.2
TOTAL	45	

Se colocó 5 ul de RNA por reacción, excepto en el control negativo en donde se puso 5 ul de agua grado PCR.

En la Tabla 2.31 se detallan los componentes de la master mix usados para una reacción con volumen final de 10 ul, se usan las condiciones optimizadas para género específico

Tabla 2.31 Volúmenes de los reactivos usados para la preparación del master mix, se señala el volumen requerido para una reacción (1X) y para las reacciones necesarias para este ensayo, 3 reacciones (3X). El volumen final de la reacción sin RNA es de 9 ul. Los primers usados son para serotipo específico.

Reactivo	Volumen (ul)	
	1X	3X

2X Reaction Mix	5	15
Primer D1	0.1	0.3
Primer TS3	0.1	0.3
Taq	0.5	1.5
H ₂ O PCR	3.3	9.9
TOTAL	9	

Se colocó 1 ul de RNA por reacción, excepto en la reacción de control negativo que tenía 1 ul de agua grado PCR

Las muestras descritas en las dos tablas anteriores se llevaron al termociclador bajo los ciclos de la siguiente Tabla.

Tabla 2.32 Programa de RT-PCR optimizado usado en el termociclador para la amplificación de las muestras de RNA de dengue

# Ciclos	Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	Síntesis de cDNA	45	45 min
	Denaturación	94	30 seg
35	Annealing	57	45 seg
	Extensión	72	1 min
1	Extensión final	72	4 min
	Final hold	4	

2.5.7 Análisis cuantitativo

Este análisis se realizó para determinar el límite de detección de la prueba RT-PCR debido a la dificultad de cuantificación del RNA por los métodos previamente descritos

Fue necesario primero hacer un ensayo RT-PCR con las condiciones optimizadas y cargar las muestras junto con un marcador de peso molecular cuantitativo, low DNA mass ladder, diluido seriadamente 5 veces.

Se repitió el ensayo, para verificar el límite de detección, para esto se diluyó el ladder 6 veces y el producto de RT-PCR se diluye 8 veces. En un gel de agarosa al 2% se cargó 8 ul de la muestra con 2 ul de loading buffer

Para que el ensayo no presente variabilidad fue necesario hacer un master mix, con todos los reactivos del kit, esta mezcla fue almacenada sin RNA a -80°C , y se usó para todos los ensayos posteriores.

Para realizar el análisis cuantitativo, se trató de construir la curva exponencial o logística de aparición del producto, que consiste en observar la presencia o ausencia de producto de PCR cada determinado número de ciclos; para esto se dejó que las reacciones en el termociclador sean sometidas al proceso de síntesis de cDNA, y cada 5 ciclos del proceso de amplificación se sacaron 2 reacciones y mediante geles de agarosa se determinó si hay o no aparición de producto.

2.5.7.1 Rango de ciclos: 5 – 40

La reacción optimizada fue para 35 ciclos, por lo que el rango que se uso para este ensayo varió entre 5 y 40, se ensambló la master mix de acuerdo a las condiciones optimizadas y se evaluó la aparición de producto a los 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 ciclos.

2.5.7.2 Rango de ciclos: 30 – 55

El producto aparece solo a partir de los 35 ciclos, por lo que se ensambla la master mix de acuerdo a las condiciones optimizadas y se evaluó hasta que número de ciclos hay aparición de producto de PCR, el ensayo se hizo para 30, 33, 35, 37, 40, 42, 45, 47, 49, 51, 53 y 55 ciclos.

2.6 Análisis de datos

No se realizó análisis de datos en este trabajo, ya que no se pudo trabajar estadísticamente debido a la dificultad presentada para la cuantificación del RNA del virus, la evaluación se hizo en términos de presencia o ausencia de bandas de amplificación. El análisis cuantitativo no fue concluido por problemas técnicos en el laboratorio.

CAPITULO 3: RESULTADOS

3.1 Pruebas preliminares con DNA humano

Para comprobar la eficacia y el correcto funcionamiento del kit de extracción y del kit para RT-PCR, se realizaron ensayos con RNA obtenido de sangre total extraída de voluntarios en nuestro laboratorio.

3.1.1 Electroforesis de RNA extraído a partir de sangre total

La electroforesis del RNA obtenido mediante el método descrito en la sección 2.5.1.1, se realizó en un gel de agarosa al 0.8% durante 2 horas a 120 V.

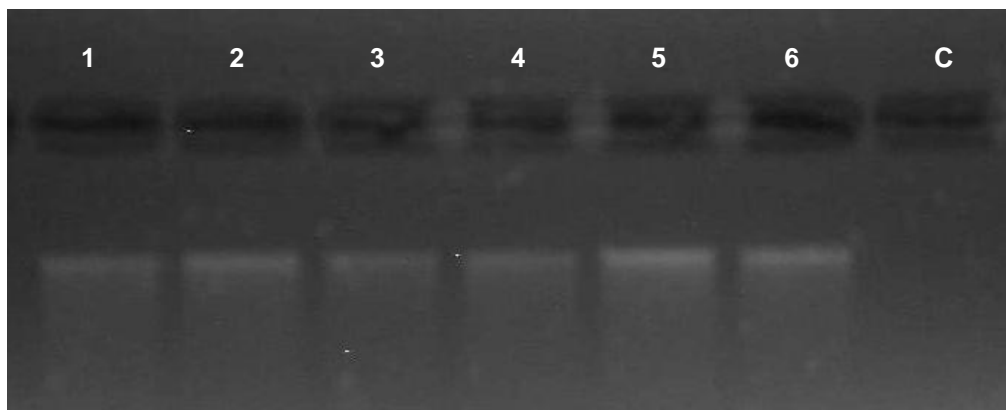


Fig 3.1 Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio de muestras de RNA extraídas a partir de sangre total. En las líneas 1-6 las bandas correspondientes a la muestra, C es el control de extracción usado en el método.

3.1.2 Cuantificación de RNA por fluorimetría.

El proceso para el uso del fluorómetro se describe en la sección 2.5.1.2.1. En la siguiente tabla se observan los valores Qf, lectura del fluorómetro, y la concentración en ng/ml y en ng/ul de las muestras de RNA de sangre. Para verificar la consistencia de la lectura del fluorómetro, se realiza 2 veces la medición de cada muestra.

Tabla 3.1 Resultados de la cuantificación mediante el fluorómetro Qubit y el Quant-iT RNA assay kit, de RNA se sangre total, la lectura en el fluorómetro se realiza dos veces. Se calcula la concentración de cada muestra en ng/ml y en ng/ul.

Muestra	Qf	x	Concentración (ng/ml)	Concentración ng/ul
(RNA) a	41,8	5	1672	1,672
(RNA) b	78,7	5	3148	3,148
(RNA) c	65,5	5	2620	2,62
(RNA) d	28,9	5	1156	1,156
(RNA) f	41,2	5	1648	1,648
(RNA) g	44,6	5	1784	1,784

2º Lectura

(RNA) a	40,6	5	1624	1,624
(RNA) b	80,5	5	3220	3,22
(RNA) c	66,6	5	2664	2,664
(RNA) d	29,8	5	1192	1,192
(RNA) f	46,1	5	1844	1,844
(RNA) g	45	5	1800	18

Los valores de concentración de RNA en ng/ul, son similares en las dos lecturas, la variación que se presenta es mínima.

3.1.3 Amplificación de los factores de coagulación II y V

En la siguiente figura se observa la foto obtenida a través del fotodocumentador UV del gel de agarosa al 2%, en donde se visualizan los fragmentos de amplificación correspondientes a los factores de coagulación II y V

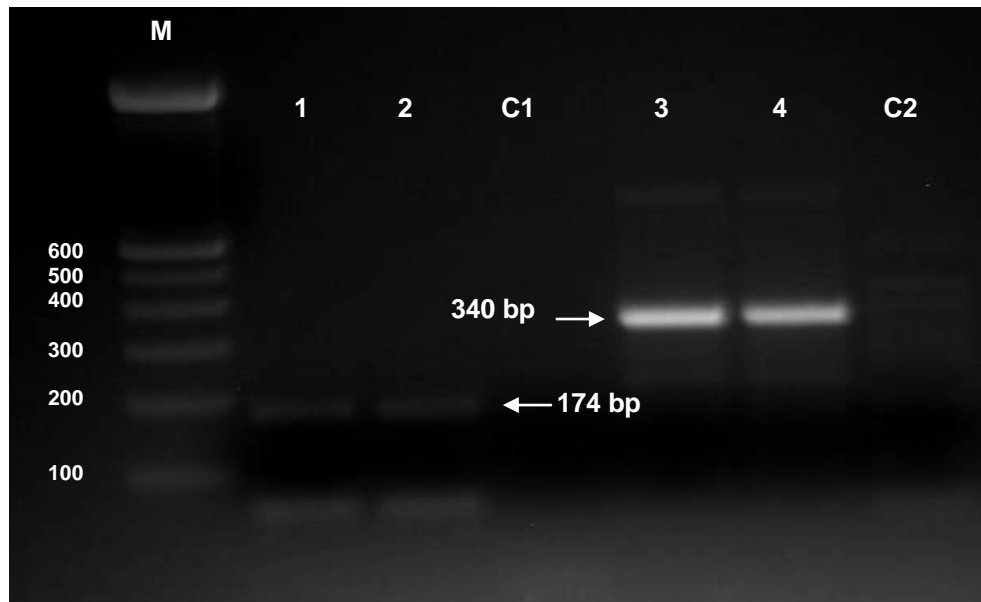


Fig 3.2 Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio de resultados RT-PCR de los factores de coagulación, la extracción de RNA de sangre total se detalla en metodología. En las líneas 1 y 2 el amplicón esperado (174 bp) para el factor de coagulación V, en las líneas 3 y 4 el amplicón esperado (340 bp) para el factor de coagulación II. C1 y C2 son los controles negativos y M el marcador de peso molecular.

Las bandas obtenidas para cada dupleta son consistentes, y no se visualizó contaminación en los controles negativos.

3.2 Pruebas de optimización a partir de cultivo viral de dengue

El serotipo usado en todas las pruebas de optimización del método diagnóstico de dengue, corresponden al serotipo 3. Las pruebas realizadas fueron para la optimización de volumen de reacción y para concentración de reactivos.

3.2.1 Electroforesis de muestras de RNA extraídas a partir de cultivo viral de dengue serotipo 3

La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 0.8% en TAE 1X durante 2 horas, el gel se revisó mediante el fotodocumentador UV a los 30 minutos, a la hora, a la hora y media y a las dos horas. No fue posible observar alguna banda en el gel. Por tanto se procede a la cuantificación de RNA mediante fluorometría.

3.2.2 Cuantificación de muestras de RNA de dengue mediante fluorometría

Se realizó a través del fluorómetro Qubit mediante el protocolo descrito en la sección 2.5.1.2.1

En la Tabla 3.2 se observa la medición dada por el fluorómetro (Qf), en todos los casos se obtuvo un dato de < 20 ng/l, es decir el Qubit no pudo detectar la cantidad exacta de material genético presente en cada muestra debido a la poca cantidad de RNA que se puede extraer de muestras virales

Tabla 3. 2 Resultados de la cuantificación mediante el fluorómetro Qubit y el Quant-iT RNA assay kit, de RNA de dengue serotipo 3. El fluorómetro no puede detectar la cantidad de RNA presente en cada vial de extracción, por lo cual no es posible obtener una cantidad en ng/ul

1° Lectura	
Muestra	Qf
Dengue (RNA) 1	< 20 ng/l
Dengue (RNA) 2	< 20 ng/l
Control negativo 1	< 20 ng/l

2° Lectura	
Muestra	Qf
Dengue (RNA) 1	< 20 ng/l
Dengue (RNA) 2	< 20 ng/l
Control negativo 1	< 20 ng/l

3.3 Pruebas de RT-PCR para dengue virus serotipo 3

Como se describió en 2.5.3 se probaron 2 metodologías (Yun Shu *et al.* 2003). **Método 1** y (Lanciotti et al, 1992). **Método 2**

Se realizaron pruebas de RT-PCR en base a los dos métodos para determinar aquel que proporcione mejores resultados de amplificación.

3.3.1 Ensayos con Método 1 para dengue virus

Se probó el método para la amplificación de dengue virus género específico mediante el uso de los primers DN-F y DN-R, y para obtener el fragmento correspondiente a dengue virus serotipo 3 con los primers DN-F y D3-R

En la siguiente figura se observa la foto del gel de agarosa al 2% obtenida a través del fotodocumentador UV, en donde se visualizan los fragmentos de amplificación correspondientes a género específico (171 bp) y a serotipo específico (204 bp)



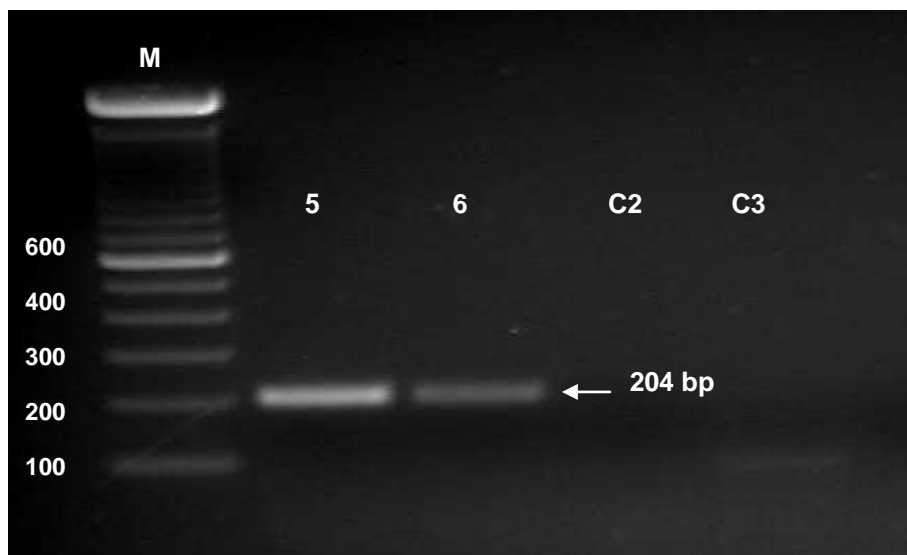


Fig 3.3 Productos de amplificación de RT-PCR usando primers de grupo (DN-F y DN-R) y serotipo específico (DN-F y D3-R). Los productos se visualizan en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Se observa el amplicón de género específico de 171 bp en las líneas 1-4, es decir el esperado para todos los serotipos de dengue, y el producto esperado para dengue serotipo 3 de 204 bp, en las líneas 5,6. C1, C2 y C3 son los controles negativos y M el marcador de peso molecular de 100 bp

No hay consistencia en las bandas correspondientes a cada dupleta, unas presentaron mayor fluorescencia que otras. Los controles negativos no presentaron contaminación.

3.3.2 Ensayos con Método 2 para dengue virus

Para el método 2, se usaron los primers para género específico D1 y D2 para la amplificación del producto esperado para todos los serotipos de dengue.

Las bandas se observan en la siguiente figura a través de la foto del gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

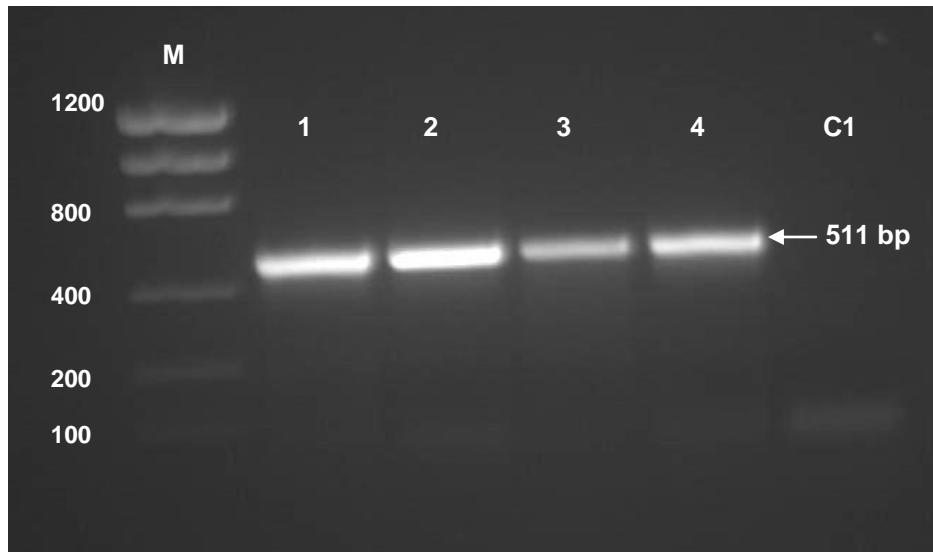


Fig 3.4 Productos de RT-PCR de muestras de RNA aisladas de cultivo viral, observados en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. En las líneas 1-4 se observa el producto de 511 bp perteneciente a dengue grupo específico. C1 el control negativo y M el marcador de peso molecular, low DNA mass ladder.

Las bandas de amplificación obtenidas a través de este método fueron mucho más intensas que las del método anterior, pero se siguió presentando el problema de consistencia de amplificación entre las dupletas.

3.3.3 Ensayo de comparación entre Método 1 y Método 2

Fue necesario elegir un método para realizar la optimización del sistema de detección de virus dengue, para esto se ejecutaron ensayos bajo las mismas condiciones de ensamblaje de master mix.

El ensayo fue realizado para género específico y se ensamblaron las reacciones con los primers correspondientes a cada método. Para el método 1 se usaron los primers DN-F y DN-R. Para el método 2 se usaron los primers D1 y D2.

En la figura 3.5, se observan los productos de amplificación esperados para género específico, es decir, el perteneciente a todos los serotipos de dengue.

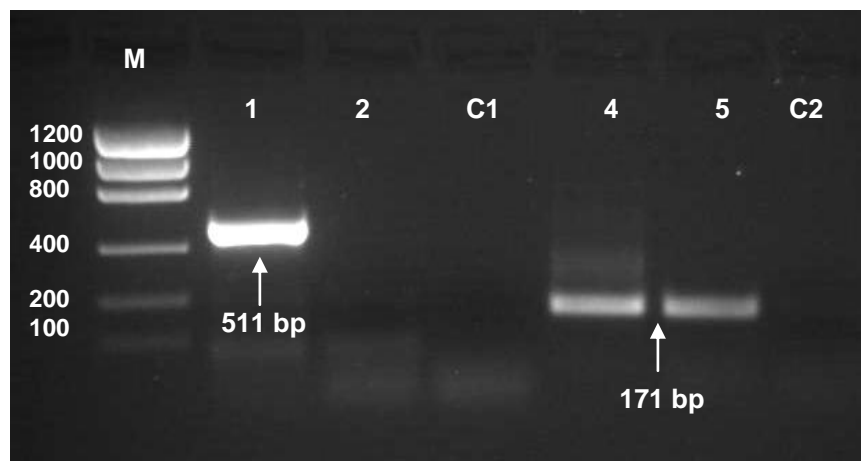


Fig 3.5 Análisis de productos de RT-PCR de RNA obtenido de cultivos de dengue virus, en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Líneas 1 y 2 son dupletas de la reacción para género específico del método 2, solo se observa el producto de 511 bp en la línea 1. Las líneas 4 y 5 pertenecen a dupletas para género específico del método 1 en donde se obtiene el amplicón esperado de 171 bp. C1 y C2 son los controles negativos y M el marcador de peso molecular low DNA mass ladder.

El resultado aquí obtenido, nos sirvió para elegir al método 1 como base para la optimización de la reacción que servirá para diagnosticar dengue virus. Se eligió este método debido a que la intensidad de la banda es mucho mejor que la obtenida mediante el método 2. Es necesario realizar la optimización hasta obtener una dupleta consistente.

3.4 Optimización de la reacción de RT-PCR para la identificación de dengue virus

Una vez elegido el método a utilizar como base, las variables elegidas para la optimización fueron temperatura de annealing y denaturación inicial. Las

concentraciones de los componentes usados para el ensamblaje de la master mix, fueron las indicadas en el manual del kit.

3.4.1 Dengue virus género específico

3.4.1.1 Temperatura de annealing

De acuerdo a la fórmula descrita en la sección 2.5.5.1 se calculó la temperatura de melting de los primers D1, D2, TS1, TS2, TS3 y TS4, con la temperatura calculada, se eligió un rango de temperaturas de annealing para el ensayo.

Las temperaturas elegidas fueron 55°C, 57 °C, 59 °C y 61 °C, se hicieron dupletas para cada temperatura. Las bandas se observaron en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio a través de un fotodocumentador UV

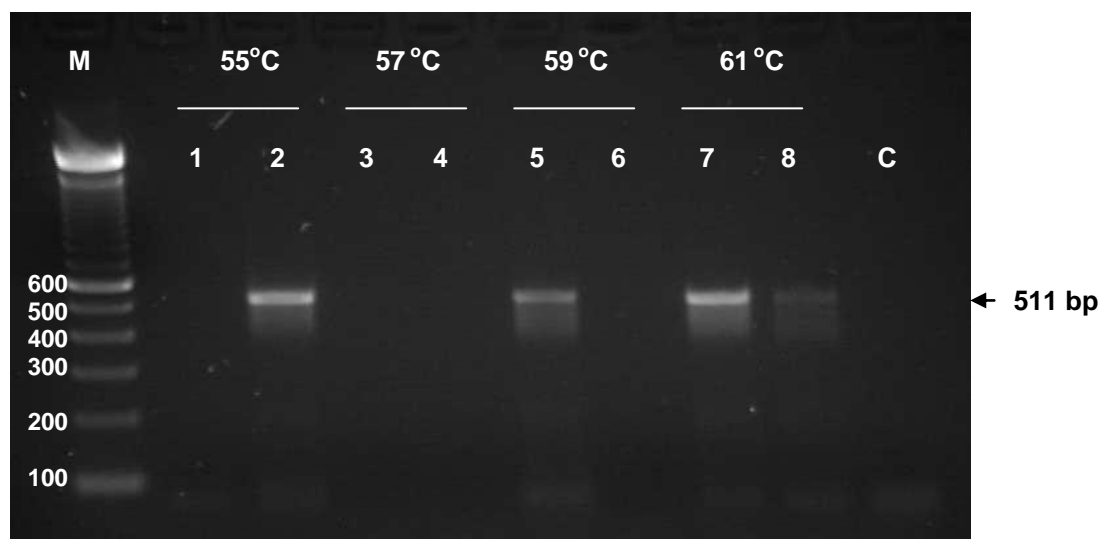


Fig 3.6 Análisis de productos de RT-PCR de RNA de dengue virus, en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, usando primers de género específico. 1 y 2 se sometieron a una temperatura de annealing de 55°C, 3 y 4 a 57°C, 5 y 6 a 59°C, 7 y 8 a 61°C. No se observa el amplicón esperado de 511 bp en todos los casos. C es el control negativo y M el marcador de peso molecular de 100 bp.

Los fragmentos de amplificación no son homogéneos e incluso a una temperatura de 57°C no se visualizan bandas. Se presumió que no se obtuvieron fragmentos adecuados debido a la degradación del RNA extraído, por lo que se repitió el ensayo en condiciones iguales con un nuevo RNA.

En la siguiente figura se observa la foto del gel de agarosa al 2% obtenida a través del fotodocumentador UV. Este resultado fue producto de la repetición del ensayo anterior con nuevo RNA

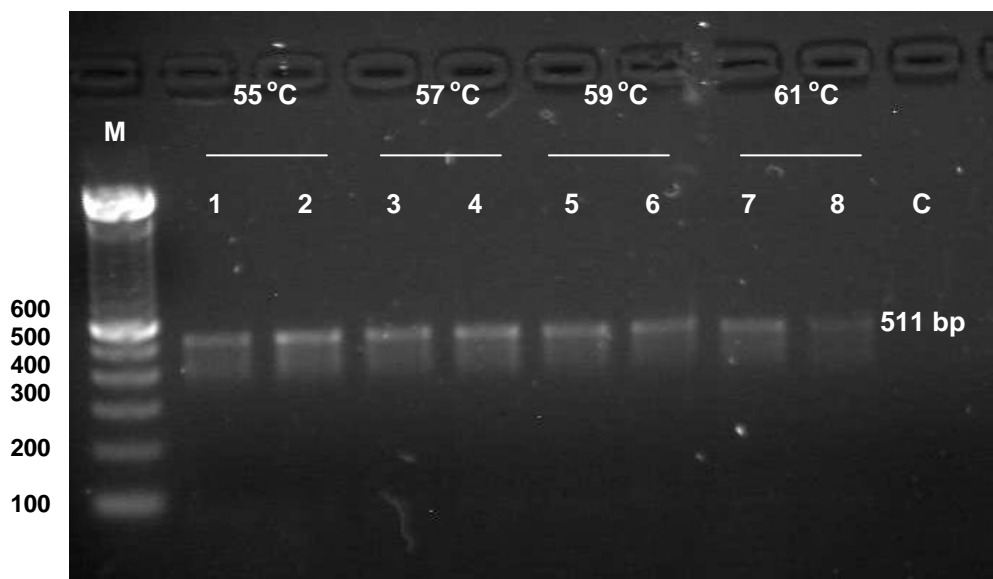


Figura 3.7 Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, de productos de RT-PCR de RNA de virus de dengue usando primers para género específico. Se muestra el amplicón de 511 bp para cada dupleta a las temperaturas de 55 °C, 57 °C, 59 °C y 61 °C. C es el control negativo y M el marcador de peso molecular de 100 bp

Los amplicones en todos los casos, es decir, para todas las temperaturas de annealing probadas, fueron consistentes, y no existió contaminación en el control negativo, pero el mejor amplicón se visualizo a 57°C, por lo cual esta fue la temperatura elegida para los ensayos posteriores.

3.4.1.2 Denaturación inicial

En la figura 3.8 se puede observar la influencia de la aplicación de denaturación inicial después de la síntesis de cDNA (RT) antes de que empiece el proceso de PCR. Las muestras fueron cargadas en el mismo gel de agarosa al 2%, para que sea más fácil la comparación visual de los fragmentos obtenidos.

El producto de 511 bp, corresponde a genero específico de virus dengue.

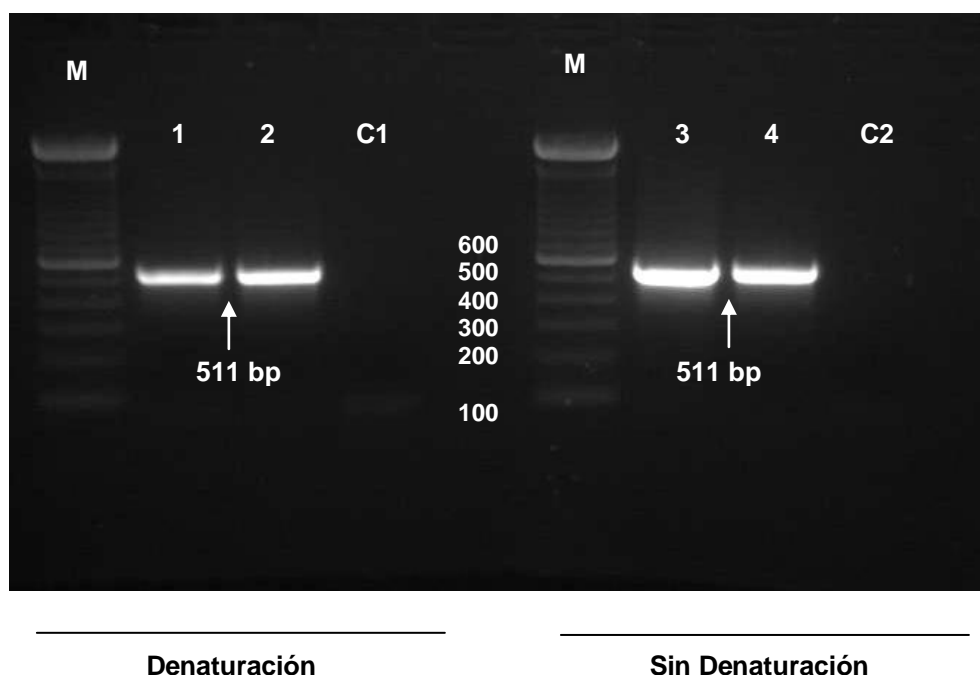


Fig 3.8 Gel de agarosa al 2% en donde se observan productos de RT-PCR de RNA de dengue virus, a las muestras 1, 2 y C1 se les aplicó denaturación inicial, mientras que a las muestras 3,4, C2 no se les aplicó denaturación inicial. En ambos casos se visualiza el producto esperado de 511 bp al usar primers para género específico. M es el marcador de peso molecular de 100 bp. C1 y C2 son los controles negativos.

La fluorescencia de los amplicones a los cuales no se les aplicó denaturación inicial es mucho más intensa, no se observó contaminación en los controles negativos, es por esta razón que se eligió trabajar sin este proceso en los ciclos programados en el termociclador.

El método optimizado para la identificación de virus dengue género específico está detallado en la Tablas 2.16 (ensamblaje master mix) y 2.18 (termociclador), en donde no se usó denaturación inicial y la temperatura de annealing óptima fue 57°C

3.4.2 Dengue virus serotipo específico

Debido a que los primers usados para la amplificación del fragmento de género específico (D1 y D2) y los de serotipo 3 (D1 y TS3) difieren en el primer reverse, D2 para género y TS3 para serotipo 3, fue necesario realizar un ensayo que permitió elegir la temperatura de annealing adecuada

3.4.2.1 Temperatura de annealing

En base a los cálculos realizados de la temperatura de melting de los primers (Anexo B), las temperaturas de annealing probadas fueron 53°C, 55°C y 57°C

En la Figura 3.9 se observa el resultado de aplicar diferentes temperaturas, para obtener el mejor producto de RT-PCR de RNA de virus de dengue serotipo 3. Los primers usados son D1 y TS3 que son específicos para el serotipo 3.

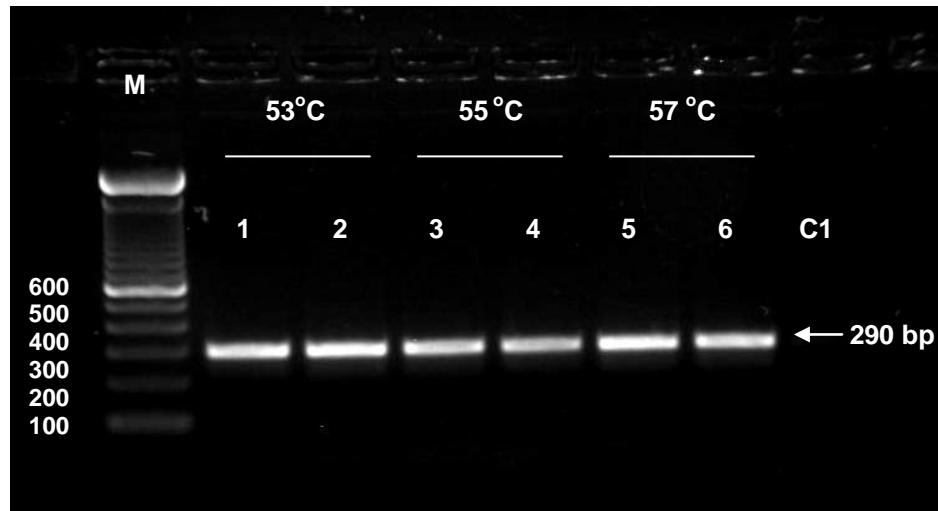


Fig 3.9 Análisis de temperaturas de annealing en gel de agarosa al 2%. Se observa el fragmento obtenido de 290 bp esperado al trabajar con primers para serotipo 3 de dengue virus, a cada dupleta se aplica temperaturas de annealing de 53°C, 57°C y 57°C. C1 el control negativo y M el marcador de peso molecular de 100 bp

El mejor amplicón se obtuvo a 57 °C por lo cual esta fue la temperatura de annealing escogida para la amplificación de dengue virus (género específico) y de dengue virus 3 (serotipo específico).

El método de diagnóstico de dengue virus se encuentra optimizado tanto para género como para serotipo específico, para una reacción de 50 ul como se indica en las Tablas 2.16 (Master Mix) y 2.18 (Termociclador)

3.5 Estandarización del volumen de reacción para RT-PCR de dengue virus.

En el primer ensayo en donde se redujo el volumen de reacción de 50 ul a 20 ul no se obtuvo amplificación, posiblemente por degradación del RNA extraído, por lo cual se procedió a realizar una nueva extracción.

Para verificar la integridad del RNA extraído se realizó un ensayo en donde se compararon los productos de amplificación resultantes del proceso optimizado anteriormente (Tablas 2.15 y 2.17), al trabajar con el nuevo RNA y con el RNA antiguo.

En la Figura 3.10 se muestran los amplicones obtenidos después del proceso de RT-PCR realizado con RNA antiguo y con RNA extraído recientemente.

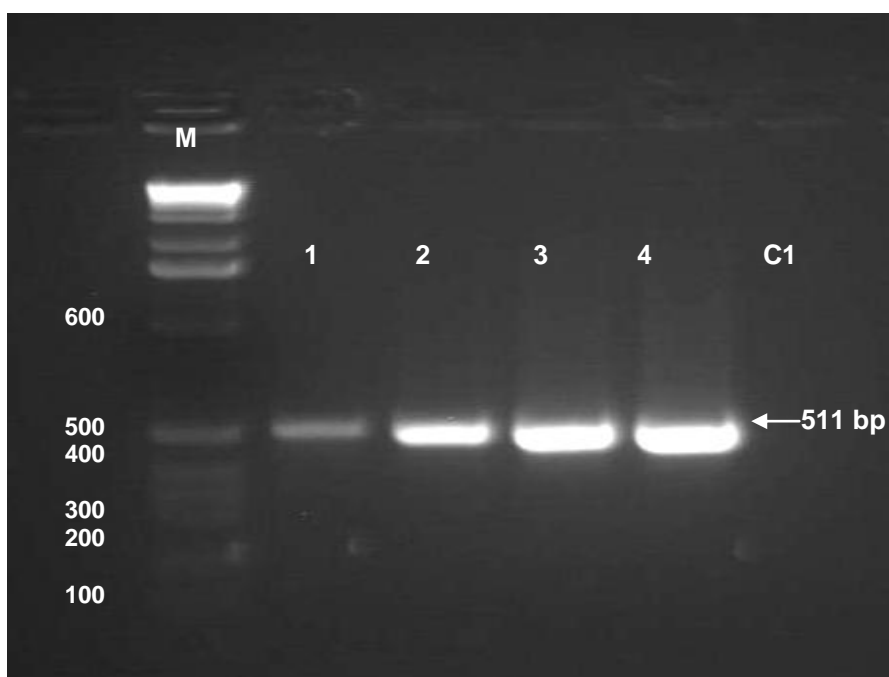


Fig 3.10 Ensayo de verificación de consistencia del RNA extraído para ensayos posteriores, realizado en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidieo. Para la obtención del producto se usaron primers de género específico que produce un amplicón de 511 bp. La reacción se realizó con las condiciones optimizadas para un volumen de 50 ul. En las líneas 1 y 2 el amplicón obtenido con RNA antiguo y en las líneas 3 y 4 el producto de RT-PCR de RNA extraído recientemente. C1 es el control negativo y M el marcador de peso molecular de 100 bp

Una vez que se comprobó la funcionalidad de la reacción optimizada con el nuevo RNA extraído, se retomó el ensayo de reducción de volúmenes de reacción. Se ensamblaron reacciones para un volumen final de 20ul, 30ul, 40ul y 50ul.

En la Figura 3.11 se observa los resultados del ensayo de volúmenes de reacción, en donde paulatinamente se reduce el volumen de 50 ul a 10 ul

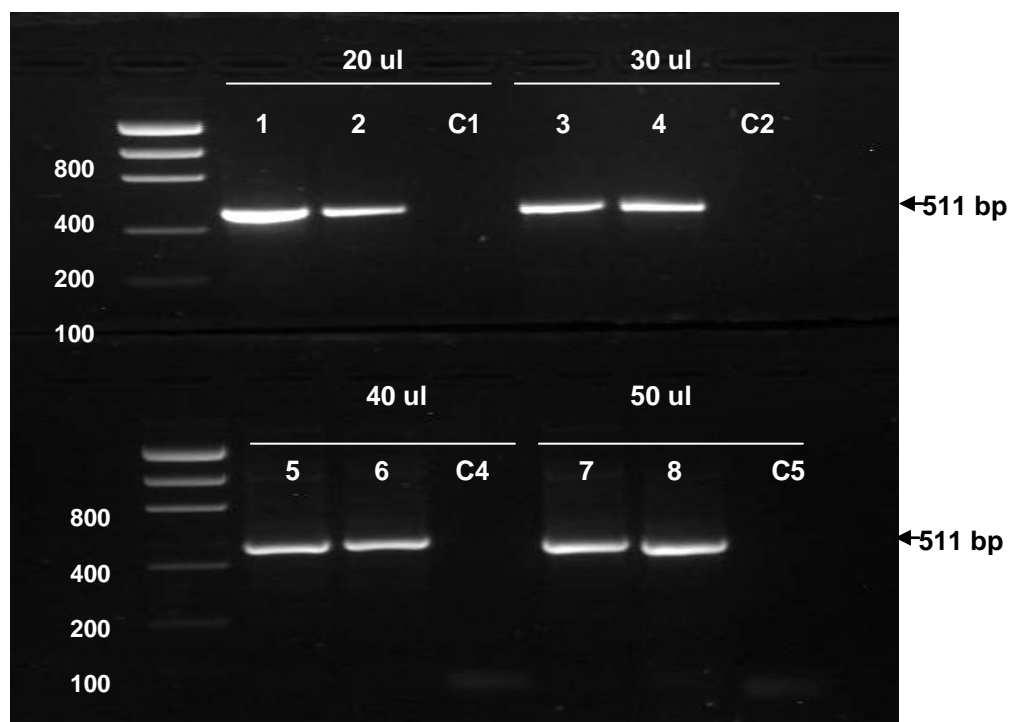


Fig 3.11 Análisis de los productos de RT-PCR de RNA de dengue virus en gel de agarosa al 2%, los primers usados para estas reacciones pertenecen a grupo específico por lo que el producto esperado es de 511 bp. Como se indica en las líneas 1, 2 y C1 se ensabló la reacción para 20 ul, en 2, 3 y C2 para 30 ul, en 5, 6 y C4 para 40 ul y 7, 8, C5 pertenecen al volumen optimizado de 50 ul. M es el marcador de peso molecular low DNA mass ladder. C pertenece a los controles negativos en cada caso.

Se obtuvieron buenos resultados con todos los volúmenes usados anteriormente es decir con 20, 30, 40 y 50 ul, por lo que se realizó un ensayo en donde se redujo más el volumen de reacción.

Como se describe en la Tabla 2.24, se ensamblaron reacciones para volúmenes finales de 10, 15 y 20 ul, en la Figura 3.12, se encuentran los amplicones correspondientes.

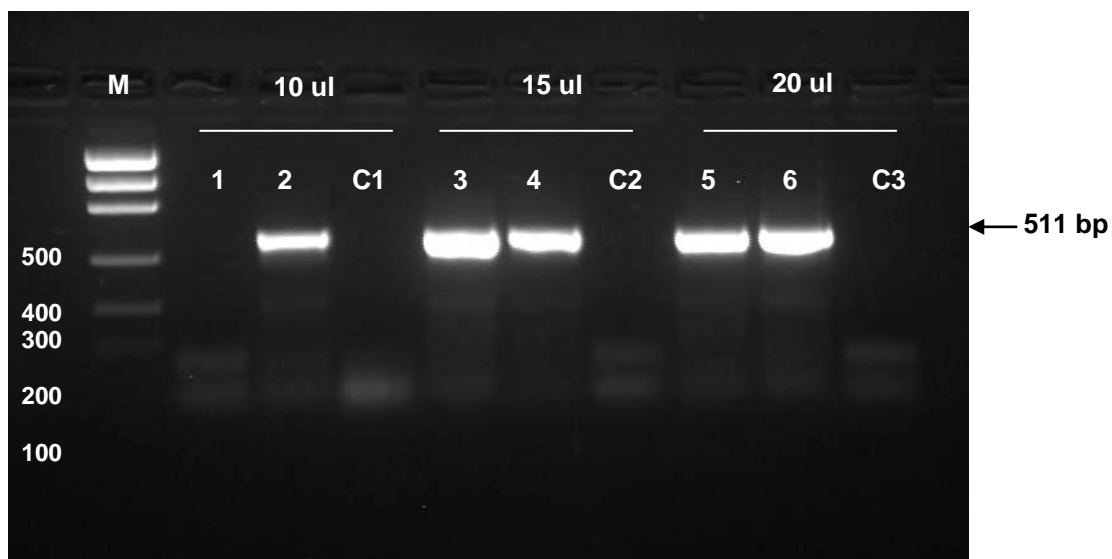


Fig 3.12 Análisis de los productos de RT-PCR de RNA de dengue virus en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, usando primers para género específico, se muestran los amplicones de 511 bp obtenidos para reacciones de 10 ul, líneas 1 y 2, 15 ul, líneas 3 y 4, 20 ul líneas 5 y 6. C1, C2 y C3 son los controles negativos en cada caso. M es el marcador de peso molecular de 100 bp.

Existió amplificación del producto de 511 bp, con todos los volúmenes probados, pero las bandas de las dupletas no eran consistentes, e incluso en la reacción de 10 ul solo se visualizó una banda. Ya que el propósito de este ensayo fue reducir al máximo el volumen de reacción, se decidió continuar trabajando con 10 ul y optimizar concentraciones de primers y Taq polimerasa, hasta obtener amplicones consistentes.

En el ensayo se combinaron distintas concentraciones de primers y diferentes volúmenes de Taq polimerasa (Tablas 2.25, 2.26 y 2.27). Todas las reacciones fueron ensambladas en condiciones homogéneas y fueron llevadas al mismo tiempo al termociclador.

En la Figura 3.13 se observan las bandas obtenidas correspondientes al fragmento de 511 bp (genero específico). La fluorescencia en cada caso es diferente y también se nota en ciertos casos la formación de productos inespecíficos

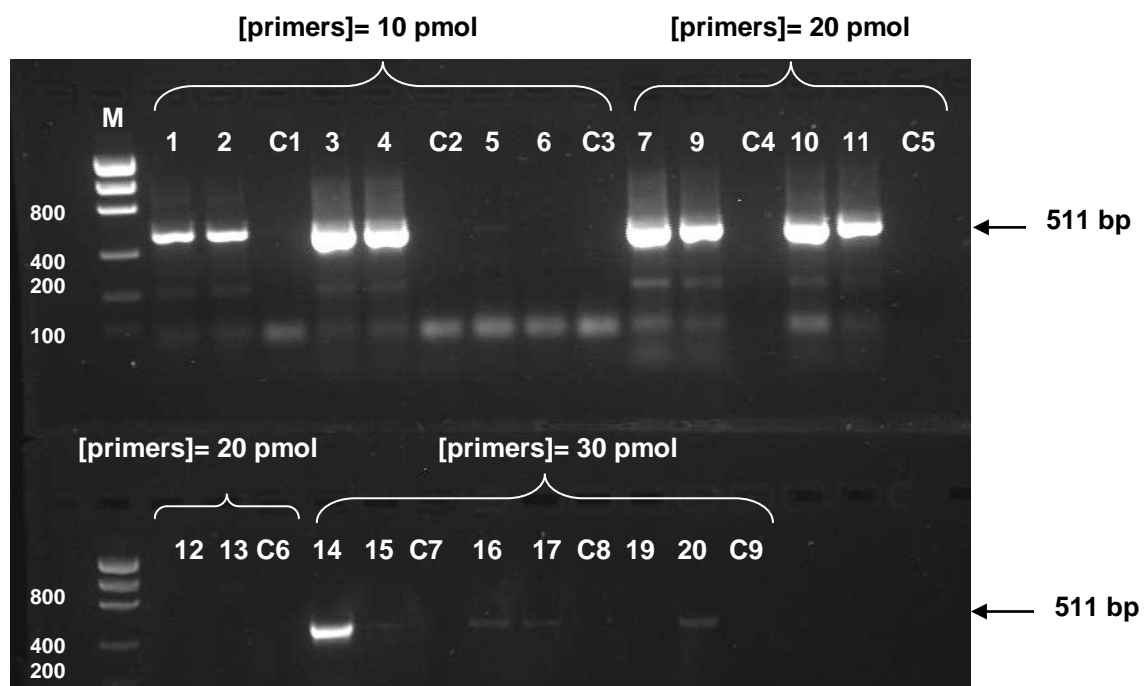


Fig 3.13 Electroforesis en gel de agarosa al 2% para el análisis de productos de RT-PCR de RNA de dengue virus usando primers de género específico, se observa el amplicón de 511 bp, al usar concentraciones de primers de 10 pmol (1-C3), de 20 pmol (7-C6) y de 30 pmol (14-C9). En este ensayo también se varía la concentración de Taq polimerasa se usan 0,5 ul en 1, 2, 7, 9, 14, 15; 1 ul de Taq en 3, 4, 10, 11, 16, 17; y 2 ul en 5, 6, 12, 13, 19, 20. C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, son los controles negativos en cada caso y M el marcador de peso molecular low DNA mass ladder.

La mejor dupleta de amplificación se obtuvo al usar 10 ul de reacción con una concentración de primers de 10 pmol y 0,5 ul de Taq polimerasa, por lo que se procedió a optimizar las temperaturas de annealing para esta reacción.

En la figura 3.14 se observa el resultado del ensayo con temperaturas de 55°C, 57°C y 59°C

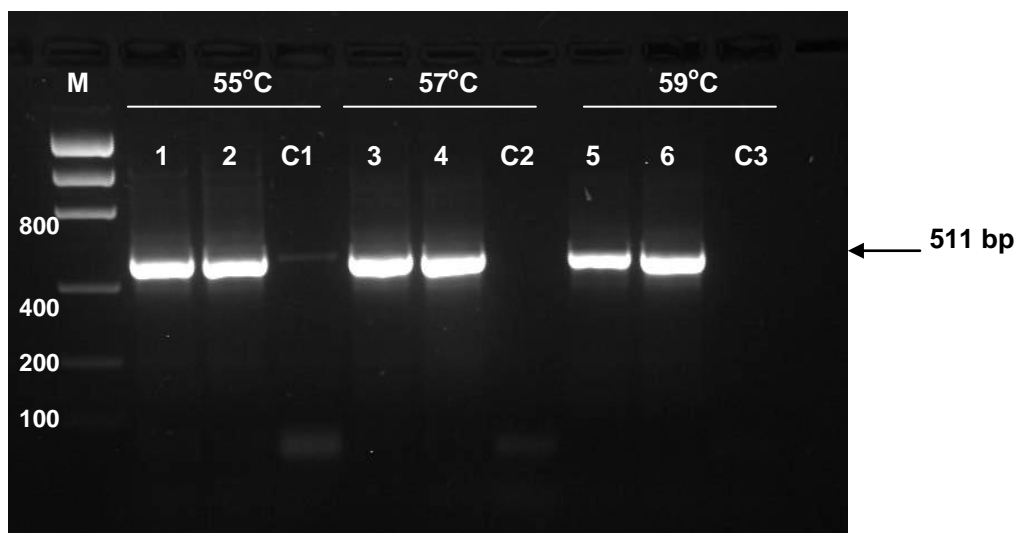


Fig 3.14 Análisis de productos de RT-PCR de RNA de dengue virus con el uso de primers de género específico. Se utiliza una reacción mix de 10 ul con una concentración de primers de 10 pmol y 0,5 ul de taq, se prueban diferentes temperaturas de annealing como se indica, 55 °C en las líneas 1,2, C1; 57 °C en 3, 4, C2 y 59 °C en las líneas 5, 6, C3. C corresponde a los controles negativos para cada temperatura y M es el marcador de peso molecular low DNA mass ladder.

Como se observa en la Figura 3.14, el mejor amplicón se obtuvo al usar temperatura de annealing de 57°C, con un volumen de reacción de 10 ul, 0.5 ul de Taq polimerasa y concentración de primers de 10 pmol, por tanto la reacción de detección de virus dengue género específico (amplicón de 511 bp) con un volumen de 10 ul se optimizó de acuerdo a lo descrito en las Tablas 2.28 y 2.29

3.5.1. Optimización de volumen de reacción para dengue virus serotipo específico.

Una vez optimizado el volumen de reacción para dengue virus con primers para género específico, fue necesario probar la reacción para serotipo específico. Se siguieron las mismas condiciones de la reacción optimizada para género específico, pero se usaron los primers para serotipo D1 y TS3.

Se realizó a la par el ensayo previamente optimizado para serotipo 3, con un volumen final de reacción de 50 ul, y el ensayo con volumen final de 10 ul para comparar los resultados obtenidos. Ya que en este punto se hizo una nueva extracción de RNA, lo descrito anteriormente, se ejecutó con RNA antiguo y con RNA nuevo.

En la figura 3.15 se encuentran los amplicones correspondientes a serotipo 3 de virus dengue (290 bp). Las bandas obtenidas al trabajar con RNA antiguo presentaron fluorescencia notoriamente baja en comparación con las bandas en donde se usó nuevo RNA.

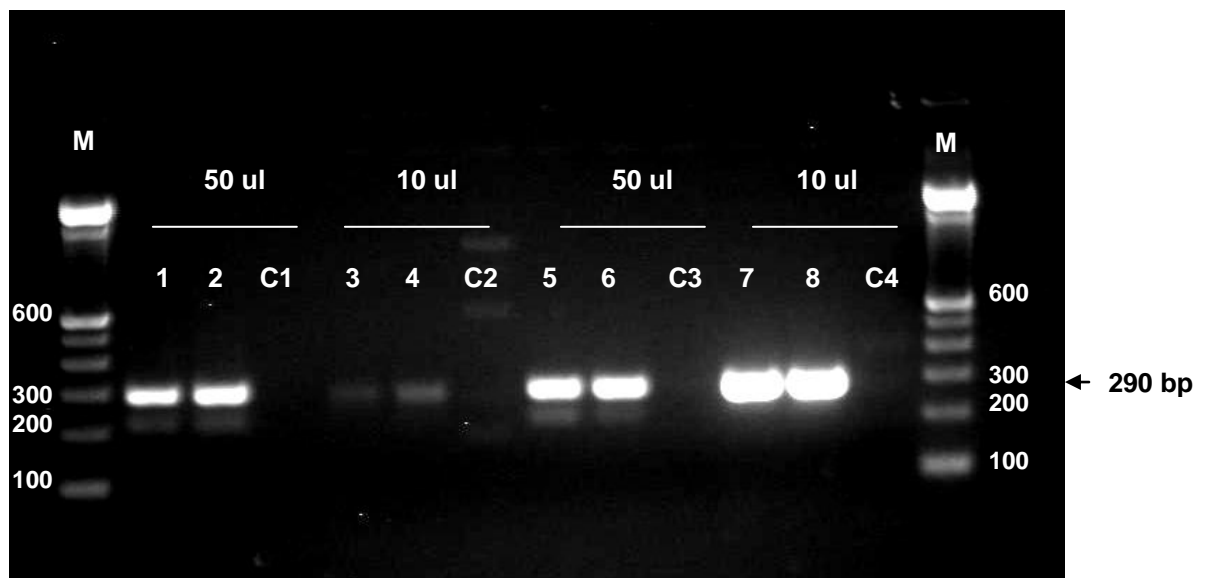


Fig 3.15 Análisis de productos de RT-PCR de RNA de dengue virus en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, con el uso de primers de serotipo específico, se indica el resultado obtenido al trabajar con RNA de una extracción anterior (1-C2), en donde 1,2, C1 pertenece a la reacción con volumen de 50 ul y 3,4, C2 a la reacción de 10 ul. En las líneas 5- C4 se indica el ensayo con RNA de la última extracción: 5,6, C3 corresponden a la reacción optimizada con 50 ul y 7,8, C4 a la reacción con volumen final de 10 ul. En todos los casos se obtiene el amplicón esperado de 290 bp. C, control negativo en cada reacción y M el marcador de peso molecular de 100 bp

Los fragmentos de amplificación obtenidos en la reacción de 10ul son consistentes, no existió formación de productos inespecíficos y no hubo contaminación en el control, por tanto, para la reacción optimizada de identificación de serotipo específico se uso 10 ul de volumen final de reacción con 10 pmol de primers, 0,5 ul de Taq polimerasa, 57°C de temperatura de annealing, sin uso de denaturación inicial.

3.6 Resumen de las condiciones optimizadas para identificación de virus dengue género y serotipo específico.

A continuación se describen las condiciones que se llevaron a cabo para el ensamblaje de la master mix y el proceso del termociclador, para la identificación de virus dengue.

Género específico

En las tablas 3.3 y 3.4 se especifican las condiciones optimizadas para la identificación de virus dengue género específico para una reacción con volumen final 50 ul y para una reacción con volumen final de 10ul

Tabla 3.3 Condiciones optimizadas para el ensamblaje de la Master mix y proceso en el termociclador que permiten la identificación de virus dengue género específico, para una reacción con volumen final de 50 ul

Master mix

Termociclador

Reactivo	Vol (ul)	# Ciclos	Proceso	T (°C)	Tiempo
	1X				
2X Rxn Mix	25	1	Síntesis de cDNA	45	45 min
Primer D1	0.3		Denaturación	94	30 seg
Primer D2	0.3	35	Annealing	57	45 seg
Taq	2		Extensión	72	1 min
H2O PCR	17.4	1	Extensión final	72	4 min
TOTAL	45		Final hold	4	

Tabla 3.4 Condiciones optimizadas para el ensamblaje de la Master mix y proceso en el termociclador que permiten la identificación de virus dengue género específico, para una reacción con volumen final de 10 ul

Master mix		Termociclador			
Reactivo	Vol (ul)	# Ciclos	Proceso	T (°C)	Tiempo
	1X				
2X Rxn Mix	5	1	Síntesis de cDNA	45	45 min
Primer D1	0.1		Denaturación	94	30 seg
Primer D2	0.1	35	Annealing	57	45 seg
Taq	0.5		Extensión	72	1 min
H2O PCR	3.3	1	Extensión final	72	4 min
TOTAL	9		Final hold	4	

Serotipo específico

Las Tablas 3.5 y 3.6 muestran las condiciones optimizadas para la identificación de virus dengue serotipo 3, para reacciones con volumen final de 50 y 10 ul

Tabla 3.5 Condiciones optimizadas para el ensamblaje de la Master mix y proceso en el termociclador que permiten la identificación de virus dengue serotipo 3, para una reacción con volumen final de 50 ul

Master mix		Termociclador			
Reactivo	Vol (ul)	# Ciclos	Proceso	T (°C)	Tiempo
	1X				
2X Rxn Mix	25	1	Síntesis de cDNA	45	45 min
Primer D1	0.3		Denaturación	94	30 seg
Primer D2	0.3	35	Annealing	57	45 seg
Taq	2		Extensión	72	1 min
H2O PCR	17.4	1	Extensión final	72	4 min
TOTAL	45		Final hold	4	

Tabla 3.6 Condiciones optimizadas para el ensamblaje de la Master mix y proceso en el termociclador que permiten la identificación de virus dengue serotipo 3, para una reacción con volumen final de 10 ul

Master mix		Termociclador			
Reactivo	Vol (ul)	# Ciclos	Proceso	T (°C)	Tiempo
	1X				
2X Rxn Mix	5	1	Síntesis de cDNA	45	45 min
Primer D1	0.1		Denaturación	94	30 seg
Primer D2	0.1	35	Annealing	57	45 seg
Taq	0.5		Extensión	72	1 min
H2O PCR	3.3	1	Extensión final	72	4 min
TOTAL	9		Final hold	4	

3.7 Análisis Cuantitativo

Debido a la dificultad presentada para cuantificar el RNA extraído previo a la reacción de RT-PCR, se realizó este ensayo para determinar la cantidad inicial de RNA a partir del producto obtenido.

En la Figura 3.16 se observa el primer ensayo, en donde se realiza una RT-PCR con las condiciones optimizadas y se visualizan las bandas en un gel de

agarosa al 2% junto con el ladder cuantitativo (low DNA mass ladder), diluido seriadamente 5 veces. El proceso de dilución del ladder se realizó para obtener una banda de determinada intensidad que pueda ser comparable con la fluorescencia de la banda correspondiente al amplicón de virus dengue.

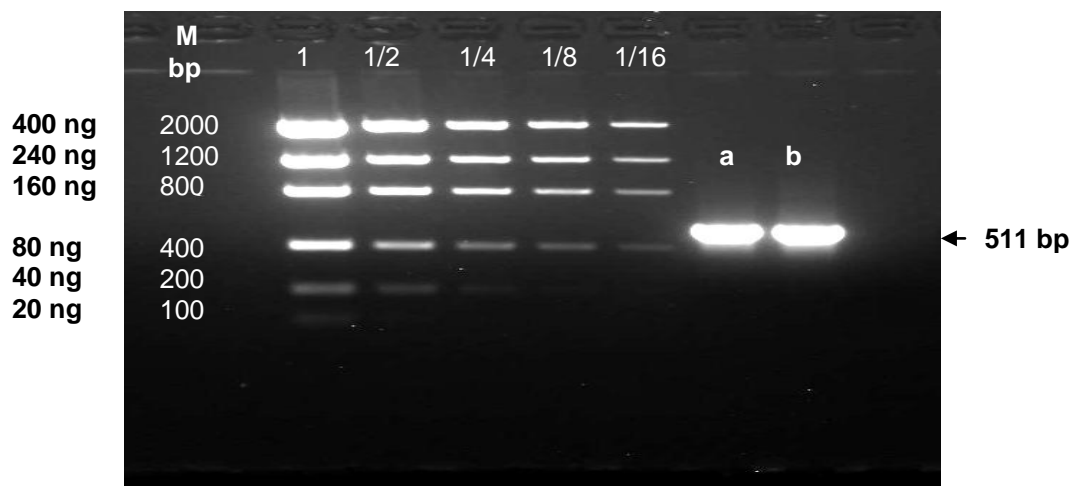


Fig 3.16 Cuantificación de cDNA de dengue virus en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Se muestran las diluciones 1, 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16 del marcador de peso molecular cuantitativo (low DNA mass ladder). Se indica a la izquierda el tamaño de cada fragmento del marcador de peso molecular en pb y su cantidad correspondiente en ng. a, b muestran el amplicón de 511 bp esperado al trabajar con primers de género específico.

El amplicón obtenido de 511 bp (Fig 3.16) es muy intenso por lo que no pudo ser comparado con ninguna de las bandas de dilución del ladder, por esta razón se ejecuta un ensayo en donde se diluye el producto de RT-PCR.

En la Figura 3.17 se pueden observar las diluciones del low DNA mass ladder y del producto. El ladder fue diluido 5 veces, mientras que debido a la intensidad de la banda del producto de la RT-PCR, éste fue diluido 8 veces.

El producto se cargó en el gel de agarosa al 2% junto con las diluciones de ladder.



Fig 3.17 Cuantificación de cDNA de dengue virus en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Se muestran las diluciones 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 y 1/32 del marcador de peso molecular cuantitativo (low DNA mass ladder), se indica a la izquierda el tamaño de cada fragmento del marcador de peso molecular en pb y su cantidad correspondiente en ng. A la derecha de la foto se visualiza el producto de RT-PCR de 511 bp de diferentes intensidades, se señala las diluciones a las que pertenece cada banda 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 y 1/256. El círculo rojo señala las bandas que presentan mayor similitud en intensidad.

En la siguiente Tabla se muestran las cantidades de producto que tiene cada dilución de low DNA mass ladder

Tabla 3.7 Cantidad en bp y ng del marcador de peso molecular Low DNA mass ladder, y cantidad en ng de las diluciones 1, 1/2, 1/4, 1/16 y 1/32 del mismo marcador. La fila con otro color representa los valores correspondientes a la banda obtenida para virus dengue género específico de 511 bp

Low DNA mass ladder*		Diluciones Low DNA mass ladder (ng)					
bp	ng	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
2000	400	400	200	100	50	25	12,5
1200	240	240	120	60	30	15	7,5
800	160	160	80	40	20	10	5
511*	102,2	102,2	51,1	25,55	12,78	6,4	3,2
400	80	80	40	20	10	5	2,5
200	40	40	20	10	5	2,5	1,25
100	20	20	10	5	2,5	1,25	0,625

* Valores calculados

De acuerdo a los resultados de la Figura 3.16 y de las cantidades mostradas en la Tabla 3.7, la cantidad de producto encontrada en la dilución 1/16 fue aproximadamente 51,1 ng; debido a la similitud en fluorescencia de la banda correspondiente a la dilución 1/2 del low DNA mass ladder con la dilución y de la dilución 1/16 de producto RT-PCR.

Como siguiente paso se procedió al diseño de un ensayo que permita registrar desde que ciclo en la reacción de RT-PCR se visualiza aparición de producto.

El número de ciclos probados en este ensayo fueron 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40, pero solo se observó producto de amplificación a partir del ciclo 30 del proceso.

Por tanto en la Figura 3.18 se indica el resultado obtenido con los ciclos 30, 35 y 40, en los cuales se visualiza en el gel de agarosa al 2% el producto de RT-PCR.

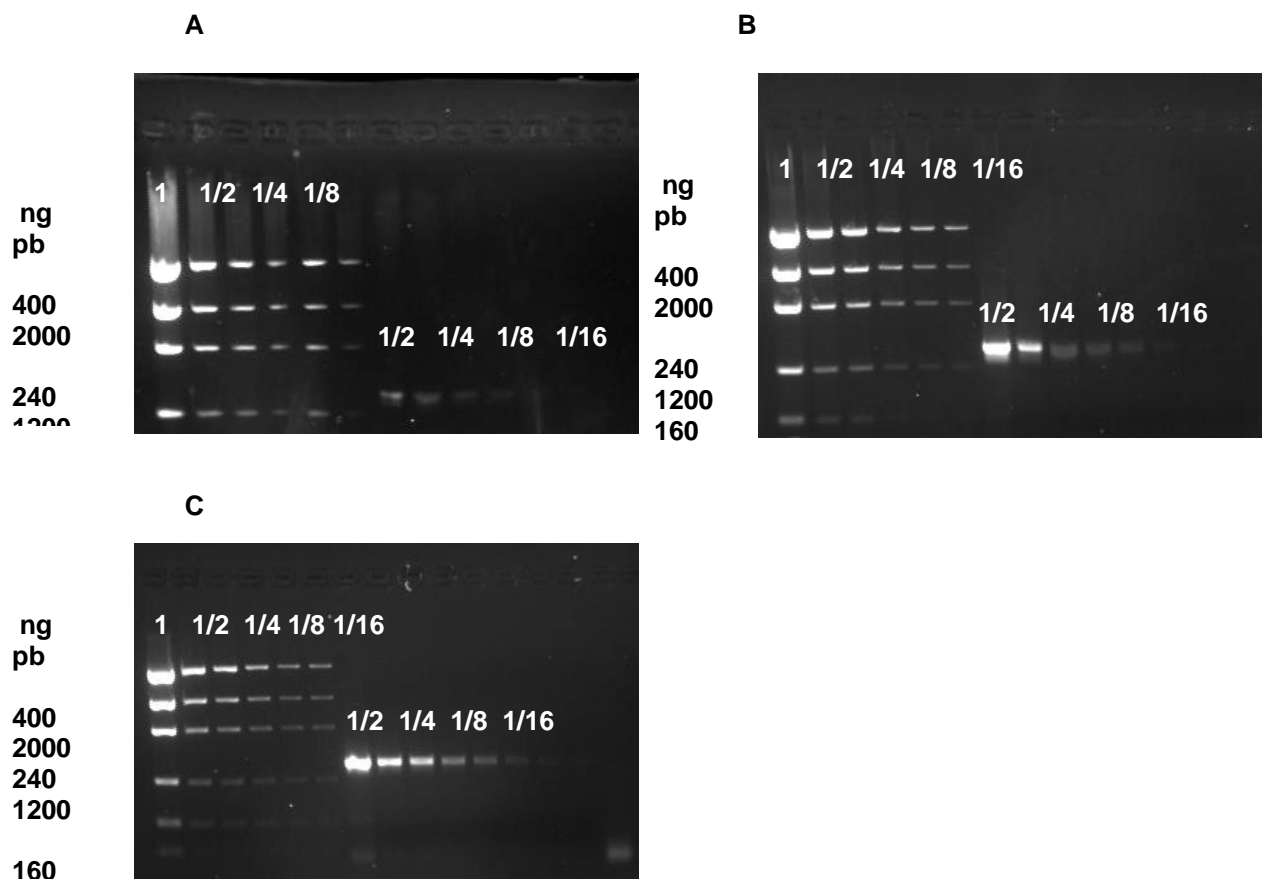


Fig 3.18 Cuantificación de cDNA de dengue virus en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Se muestran las diluciones 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 y 1/32 del marcador de peso molecular cuantitativo (low DNA mass ladder), se indica a la izquierda el tamaño de cada fragmento del marcador de peso molecular en pb y su cantidad correspondiente en ng. A la derecha de la foto se visualiza el producto de RT-PCR de 511 bp de diferentes intensidades, se

señala las diluciones a las que pertenece cada banda 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 y 1/256. A, resultados al ciclo 30; B corresponde al ciclo 35 y C al ciclo 40.

Era necesario la construcción de la curva de aparición del producto, ya que no se registraron bandas de amplificación antes de los 30 ciclos, se diseñó un ensayo para determinar hasta que ciclo el fragmento obtenido era adecuado. Es importante recordar que la reacción fue optimizada para 35 ciclos. Por tanto para el siguiente ensayo se usaron los siguientes ciclos: 30, 33, 35, 37, 40, 42, 45, 47, 49, 51, 53 y 55.

En el gel de agarosa al 2% se colocó el Low DNA mass ladder diluido y las diluciones 1/2 y 1/4 correspondientes al producto de amplificación, como se observa en la Figura 3.19.

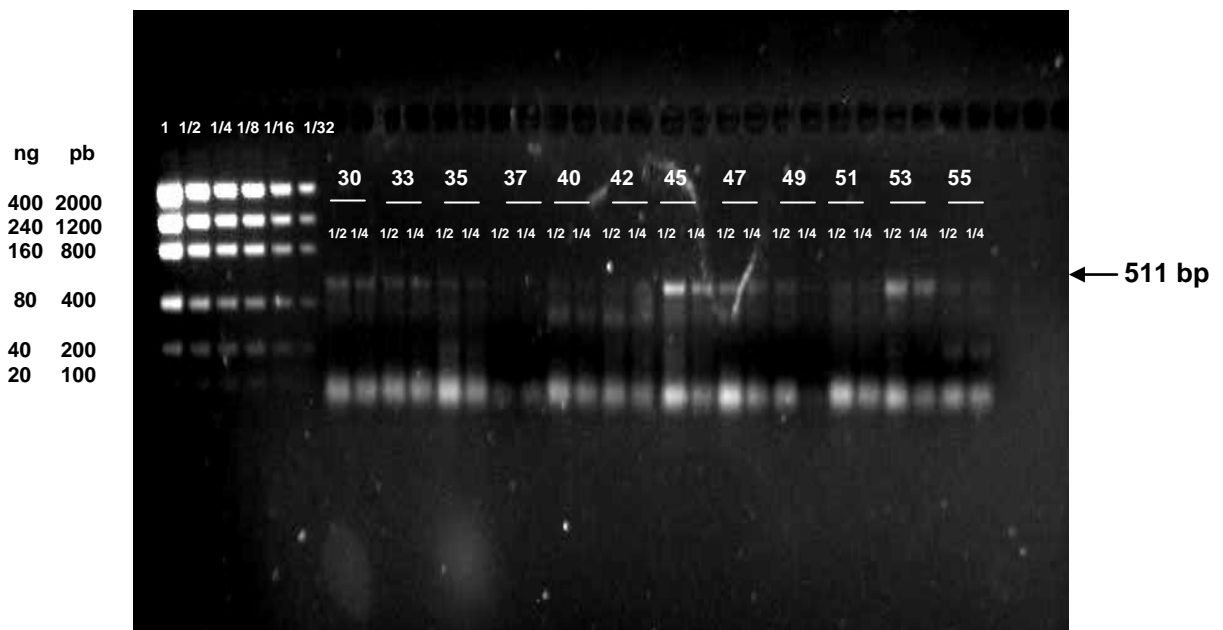


Fig 3.19 Cuantificación de cDNA de dengue virus en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Se muestran las diluciones 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 y 1/32 del marcador de peso molecular cuantitativo (low DNA mass ladder), se indica a la izquierda el tamaño de cada fragmento del marcador de peso molecular en pb y su cantidad correspondiente en ng. A la derecha de la foto se visualiza el producto de RT-PCR de 511 bp de diferentes intensidades, se señala las diluciones a las que pertenece cada banda 1/2 y 1/4 y el ciclo de PCR al que pertenece.

No fue posible obtener un resultado consistente, en todos los ciclos probados existió formación de productos inespecíficos, esto sucedió por la degradación

del RNA con el que se trabajó, ya que por un desperfecto en el ultracongelador del laboratorio, el material genético del virus tuvo que ser almacenado a -20°C y no a -80°C como se lo había mantenido.

El análisis cuantitativo no pudo ser concluido debido a la imposibilidad de obtener nuevos cultivos virales para realizar una nueva extracción de RNA.

CAPITULO 4: DISCUSIÓN

4.1 Extracción de RNA de sangre y de RNA a partir de cultivo viral de dengue

Es necesario estandarizar un método de extracción de RNA para obtener material útil para el proceso de RT-PCR, para lo cual existen variedad de protocolos que usan reactivos costosos cuyo principal objetivo es evitar la inhibición de la amplificación, sin embargo muchos de ellos no remueven totalmente las nucleasas o solo permiten obtener poca cantidad de RNA (Harris *et al*, 1998). Mediante el protocolo aquí desarrollado (modificado a partir del kit QIAamp RNA Blood Mini Kit, Invitrogen) se simplifica la extracción ya que se usa el principio de columnas sin necesidad del uso de fenol-cloroformo. Este método es sencillo, rápido, se eliminan los contaminantes en tan solo dos pasos de lavado. El RNA aquí obtenido está listo para ser usado en procesos de RT-PCR.

El proceso de extracción de RNA de sangre es más sencillo que el realizado a partir de cultivos virales, en el primero es posible observar el pellet de células en todos los pasos, mientras que con el RNA viral la visualización del pellet se hace imposible por la cantidad de virus presente en el cultivo. A pesar de esta dificultad al momento de la extracción se ha comprobado que se obtienen buenos resultados en la RT-PCR al trabajar con RNA de sangre y de cultivos virales.

Se vio la necesidad de modificar el protocolo usado para sangre (Sección 2.5.1.1) al ser utilizado con cultivo viral de dengue, por el problema en la obtención del pellet. Fue necesario incrementar las revoluciones por minuto en el proceso de centrifugación para obtener más células lisadas y conseguir más cantidad de RNA al final del proceso de extracción. Es necesario señalar que a pesar de aumentar la centrifugación, el RNA obtenido a partir del cultivo no se pudo cuantificar bajo ninguno de los métodos descritos en la Sección 2.5.2.3, debido a la baja cantidad de material genético presente en las partículas virales

Fue posible solo realizar la cuantificación del RNA de sangre, como se observa en la Tabla 3.1. Las concentraciones de RNA tienen un promedio de 20 ng/ul, lo cual comprueba que el método de extracción a partir de sangre periférica es efectivo para obtener concentraciones homogéneas de RNA.

4.2 Optimización del método RT-PCR para de detección de dengue virus

Para la estandarización de una técnica molecular es importante el análisis de las variables que influyen de manera significativa en el proceso. Es muy relevante la elección de los primers, los cuales deben ser sensibles, específicos y ser diseñados de manera adecuada para evitar la formación de primer – dimers.

La temperatura de annealing usada en el proceso es fundamental para lograr la adecuada hibridación de los primers a la secuencia blanco. Es importante también determinar exactamente el programa usado en el termociclador, tiempos, procesos, ciclos y temperaturas. Con el programa optimizado se puede hacer reproducible la reacción.

Las concentraciones de componentes usados en el ensamblaje de la reacción de RT-PCR, tales como Taq polimerasa, 2X reaction mix, influyen también en el resultado final. Todo lo mencionado anteriormente se detalla en la siguiente sección.

4.2.1 Selección de la temperatura de annealing

La hibridación del primer es muy importante ya que este se unirá a su secuencia complementaria en el DNA molde, la correcta unión depende de la temperatura de annealing de los primers la cual varía dependiendo de la composición y número de bases que los forman. El cálculo de esta temperatura para los primers de género específico reveló un rango promedio de trabajo de 55°C – 61°C, y para los primers de serotipo 3 fue de 53°C – 57°C. En ambos casos el mejor amplicón se obtuvo al trabajar con 57°C, la dupleta fue consistente y no se evidenció la formación de primer – dimers o de productos no específicos.

4.2.2 Aplicación de denaturación inicial después de la síntesis de RNA a cDNA

Después del paso de transcripción reversa el RNA es sintetizado a cDNA el cual servirá para el proceso de PCR. En la Sección 2.5.5.2 se describe el ensayo en donde se prueba la aplicación de denaturación del cDNA previo al proceso de PCR (denaturación inicial). Este paso permite que las hebras del cDNA se separen para obtener así DNA monocatenario. Es posible obtener amplicones consistentes tanto al aplicar denaturación inicial como al no hacerlo, pero es de mejor calidad el fragmento obtenido al omitir este paso, lo cual posiblemente se debe a la estabilidad del cDNA. El proceso de denaturación inicial y el de denaturación propio del proceso de PCR pueden producir la pérdida de cierta cantidad de moléculas a ser sintetizadas.

Es importante tomar en cuenta que para la denaturación la muestra se calienta a 94-95°C. La de denaturación depende de la proporción de G+C que tenga la hebra, como también de la longitud de la misma pero habitualmente se utiliza ese rango de temperatura.

4.2.3 Análisis de los primers usados en el método optimizado de identificación de dengue virus

Los primers usados (D1, D2, TS1, TS2, TS3 y TS4) fueron seleccionados en base a regiones altamente conservadas del genoma del dengue (Lanciotti *et al*, 1988) por tanto tienen la habilidad de reconocer secuencias de RNA únicas para cada tipo de dengue virus. Esto se corrobora con los resultados obtenidos ya que al usar los primers para género específico se obtiene el amplicón de 511 bp que es el producto esperado para la identificación de todos los serotipos de dengue, mientras que el amplicón de 290 bp se identifica cuando los primers usados son los correspondientes a serotipo 3 de dengue virus.

Las condiciones de concentración óptima de los primers se determinan con el objetivo de incrementar la sensibilidad y especificidad del ensayo. Los primers de género y serotipo son altamente específicos para la detección y diferenciación del dengue virus.

Es crucial la optimización de la concentración de los primers, para prevenir la formación de primer – dimers y de productos no específicos, (Yun Shu *et al*, 2003). La concentración de primer utilizado para la reacción optimizada es de 10 pmol como se observa en la Figura 3.13, lo que se logró al realizar un ensayo en donde se analizaba el amplicón obtenido a concentraciones de 10, 20 y 30 pmol/reacción. Se observó que mientras mayor era la cantidad de primers empleado por reacción se incrementa la posibilidad de la formación de primer – dimers.

4.3 Volumen de reacción

En un inicio la reacción de RT-PCR para la identificación de dengue virus fue optimizada con un volumen de 50 ul, pero reactivos tales como la Taq polimerasa y el 2X reaction mix eran colocados en cantidades muy grandes (2 ul y 25 ul por reacción respectivamente). Con el fin de aprovechar los recursos del kit disponibles de mejor manera, se decidió bajar el volumen de reacción hasta una cantidad adecuada para que pueda ser utilizado para la electroforesis. El ensayo de reducción de volumen se hizo paulatinamente hasta llegar al volumen final de master mix de 10 ul, con lo que se logró usar 0,5 ul de Taq polimerasa y 5 ul de 2X reaction mix. El amplicón obtenido con

este volumen de reacción fue consistente y del tamaño adecuado para la identificación de dengue grupo específico o de dengue serotipo 3, por tanto las cantidades usadas en el ensamblaje de la master mix con este volumen son suficientes para lograr una reacción óptima.

4.4 Sistema RT-PCR estandarizado

Se obtuvo un alto rendimiento de los productos específicos con el sistema de amplificación estandarizado, como se observa en la Figura 3.14 y 3.15. Los resultados obtenidos en los geles de agarosa demostraron que el ensayo tiene alta especificidad ya que los amplicones generados tienen el tamaño correcto. Adicionalmente, de acuerdo a los resultados se puede decir que es un ensayo altamente reproducible.

No se vio la aparición de productos no específicos, por lo cual siempre fue posible la identificación de los fragmentos correspondientes a género y serotipo específico para virus dengue.

La calidad del RNA viral es parte indispensable para el éxito del proceso. Después de la extracción debe ser almacenado y alicuotado adecuadamente para evitar su degradación. Se logra conservar de mejor manera el RNA al ser guardado a -80°C . En nuestra experiencia, a pesar de las precauciones tomadas con el almacenaje del material genético del dengue, en algunos ensayos fue necesario realizar una nueva extracción debido a la degradación del RNA. En la última parte de este trabajo no fue posible guardar el RNA a -80°C debido a una falla en el ultracongelador, por lo que se almacenó a -20°C . A esta temperatura el RNA no se pudo conservar íntegro y se degradó, por lo que no se obtuvieron los amplicones específicos y se observó la formación de productos no específicos y de primer – dimers (Fig 3.19).

El sistema RT-PCR es muy sensible ya que las concentraciones de MgCl_2 , dNTP's y buffer están equilibradas en el 2X reaction mix lo que facilita el ensamblaje de la reacción y la optimización de menos cantidad de variables.

4.5 Consideraciones sobre la tecnología RT-PCR

La RT-PCR es un método rápido, sensible, simple y reproducible si es apropiadamente controlado y puede ser usado para detectar RNA viral a partir de muestras clínicas humanas, tejidos de autopsia o mosquitos (Gubler *et al*, 1998). Como se demuestra en este trabajo el método es apropiado también para obtener resultados apropiados a partir de cultivo viral de dengue.

El dengue es una enfermedad que se puede confundir fácilmente con hepatitis, fiebre amarilla, malaria, etc. (Callaham *et al*, 2001). Por ello, el diagnóstico diferencial resulta costoso y muchas veces tedioso por el tiempo requerido para las pruebas, es por esto que se hace necesario aplicar una técnica como la RT-PCR, que ofrezca un diagnóstico preciso y definitivo, para de esta manera manejar más eficientemente los recursos de salud y enfocarlos en estrategias de erradicación del vector de la fiebre del dengue.

La RT-PCR posee ventajas sobre los métodos tradicionales. Primeramente, es rápido ya que el ensayo toma aproximadamente 4 horas, que incluyen 1 hora para la extracción de RNA y aproximadamente 3 horas para la RT-PCR comparados con los 7-10 días que requieren las pruebas inmunológicas. Segundo, es posible evaluar simultáneamente varias muestras, por ello, tiene mejor relación costo – eficiencia. Tercero, la RT-PCR es más fácil de estandarizar y de reproducir.

En este trabajo se desarrolló y optimizó un ensayo one step RT-PCR, el cual realiza la síntesis de cDNA y la amplificación en un solo paso, disminuyendo el riesgo de contaminación por manipulación de la muestra.

La identificación de serotipo 3 de dengue fue desarrollado adecuadamente, se obtuvo el tamaño de fragmento adecuado. No se probaron reacciones con los demás serotipos, ya que solo se nos facilitó el cultivo viral de dengue serotipo 3. Es importante señalar que el principal objetivo de la identificación de serotipos permite que los laboratorios de diagnóstico cuenten con una

excelente herramienta para el monitoreo de la enfermedad, especialmente en aquellas zonas en donde el dengue es endémico.

CAPITULO 5: CONCLUSIONES

- La técnica de RT-PCR por su sensibilidad y especificidad, podría llegar a reemplazar a los métodos convencionales y convertirse en el nuevo “gold standard” para el diagnóstico de la infección por dengue virus.
- El método RT-PCR presenta ventajas en comparación con la PCR convencional, las que incluyen simplicidad, rapidez, sensibilidad y menos riesgo de contaminación.
- La mayor ventaja de este sistema es que se puede detectar y diferenciar el género o serotipo específico del virus en un solo paso usando un set específico de primers, lo que hace a esta técnica potencialmente útil en el diagnóstico clínico y en estudios epidemiológicos de esta enfermedad viral.
- En comparación con los métodos serológicos o inmunológicos la RT-PCR tiene gran especificidad y sensibilidad, especialmente durante la fase inicial de la enfermedad.
- La identificación de los serotipos circulantes del virus del dengue permite establecer en la población el riesgo asociado a la infección por diferentes serotipos en el transcurso del tiempo.
- En general, la notable dificultad para identificar los casos de dengue en las primeras horas de enfermedad, podría explicarse tanto por la presentación clínica inespecífica, como por los problemas atribuibles al proceso de notificación. Lo anterior reafirma la necesidad de encontrar herramientas que ayuden a mejorar el diagnóstico clínico de dengue y establecer reglas de decisión clínica para su identificación y manejo,

especialmente en el periodo temprano de la enfermedad cuando las pruebas serológicas son poco sensibles.

- RT-PCR puede constituir una herramienta para la identificación oportuna del dengue, cuya aplicación podría disminuir la morbi-mortalidad y ayudaría a distribuir eficientemente los recursos diagnósticos y terapéuticos, especialmente en las áreas endemo-epidémicas.
- El RNA viral puede ser extraído, amplificado y detectado directamente a partir de cultivos virales, este debe ser almacenado a -80°C para su preservación adecuada.
- En el proceso de estandarización de la técnica no se presentaron casos de inhibición de la PCR por lo que se puede concluir que el sistema de extracción provee RNA de buena calidad sin la presencia de RNasas que provoquen la inhibición de la reacción.
- La sensibilidad de los primers depende de la homología de los primers con la secuencia blanco de los genes de dengue virus, ya que se eligieron en base a sectores altamente conservados del genoma de este microorganismo. En el ensayo se obtienen fragmentos específicos que permiten la identificación de dengue género-específico y serotipo 3.
- La cuantificación del RNA viral no se puede efectuar mediante electroforesis o fluorometría debido a la cantidad obtenida en el proceso de extracción.
- La denaturación inicial influye significativamente en la calidad de amplicón obtenido, el evitar este paso después de la síntesis de cDNA permite conservar mayor cantidad de moléculas para que sean amplificadas mediante PCR, lo que se evidencia por la señal fluorescente del fragmento obtenido.
- El análisis cuantitativo de la reacción RT-PCR aunque es posible teóricamente, demanda mayores recursos y mayor tiempo. En nuestra investigación, dicho análisis no pudo ser completado por razones

financieras y técnicas. Se plantea la necesidad de realizar un ensayo PFU (plaque forming units) y completar el análisis logístico durante la fase exponencial de amplificación dentro de un proyecto futuro.

- Los avances en la biología molecular y su aplicación en los métodos diagnósticos ha permitido que la tecnología diagnóstica sea cada vez más sensible y específica y se espera que este trabajo sea un precedente para que tecnologías como RT-PCR contribuyan significativamente al tratamiento clínico, a la investigación etiológica y al control de las infecciones por dengue virus.

CAPITULO 6: RECOMENDACIONES

- El proceso de extracción de RNA requiere de condiciones de trabajo estrictas, ya que el material se puede contaminar con RNasas que posteriormente podrían inhibir la reacción RT-PCR. Es por esto que todos los materiales a ser usados deben ser esterilizados dentro de la cámara de flujo laminar y ningún material puede ser manipulado fuera de la misma.
- Debido a que no se observa el pellet viral en los procesos de centrifugación, es importante no remover todo el sobrenadante en los procesos de extracción de RNA a partir de cultivos virales, para prevenir la eliminación del material genético durante el proceso.
- Almacenar y alicuotar el RNA a -80°C en un ultracongelador, asegura la integridad del material durante más tiempo. Como opción se podría usar un estabilizador de RNA, que se coloca al RNA extraído y evita su degradación incluso a temperatura ambiente.
- Es importante alicuotar los primers y guardarlos adecuadamente, e ir usando paulatinamente las alícuotas según se requiera para los ensayos, de esta manera se evita contaminar todos los primers disponibles.

- La técnica fue optimizada para la identificación del virus del dengue a partir de la extracción de RNA de cultivos virales pero se podría optimizar el método para el diagnóstico de la enfermedad mediante su aplicación directa sobre muestras clínicas (sangre o suero), lo que haría más aplicable este sistema en laboratorios de diagnóstico en general.
- Para futuros ensayos con el uso de un kit para RT-PCR, se recomienda empezar con las cantidades y concentraciones de reactivos optimizados en este trabajo para una reacción de 10 ul, lo que permitiría aprovechar de mejor manera el kit.
- Es necesario complementar el análisis logístico, para determinar el límite de detección del ensayo RT-PCR.
- Establecer cooperación con organismos estatales para apoyar mediante tecnología de punta, los esfuerzos para control y monitoreo de la enfermedad en el país.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

1. Anderson, J., Rico-Hesse, R. (2006). *Aedes aegypti* vectorial capacity is determined by the infecting genotype of dengue virus. *Am J Trop Med Hyg.* , 75 (5), 886-892.
2. Baron, E., Peterson, L., Finegold, S. (1994). *Bailey & Scotts Diagnostic Microbiology* (Novena edición ed.). Sydney: Von Hoffmann Press.
3. Becker, J. (2002). *Behavioral endocrinology*. MIT.
4. Bente, D., Rico-Hesse, R. (2006). Models of dengue virus infection. *Drug Discov Today Dis Models* , 3 (1), 97-103.

5. Burke, D., Nisalak, A., Johnson, D., Scott, R. (1988). A prospective study of dengue infections in Bangkok. *Journal of Tropical Medicine* , 38 (5), 172-180.
6. Callahan, J., Wu, S.-J., Schultz, A., Mangold, B., Peruski, L., Watts, D., Porter, K., Murphy, G., Suharyono, W., King, C., Hayes, C., Temenak, J. (2001). Development and Evaluation of Serotype and Group-Specific Fluorogenic Reverse Transcriptase PCR (TaqMan) Assays for Dengue Virus. *Journal of Clinical Microbiology* , 39 (11), 4119-4124.
7. Chien, L.-J., Liao, T.-L., Shu, P.-Y., Hsiung Huang, J., Gubler, D., Chang, G. (2006). Development of Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assays To Detect and Serotype Dengue Viruses. 44 (4), 1295-1304.
8. Clarke, T. (2002). Dengue Virus: Break-Bone fever. *Nature* , 416 (14), 672-674.
9. Dengue and Dengue hemorrhagic fever. (2002). *World Health Organization* , 117.
10. Dieffenbach, C., Dveksler, G. (2003). *PCR primer* (Segunda edición ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory press.
11. Domingo, C., Palacios, G., Niedrig, M., Cabrerizo, M., Jabado, O., Reyes, N., Lipkin, W., Tenorio, A. (2004). A New Tool for the Diagnosis and Molecular Surveillance of Dengue Infection in Clinical Samples. *Dengue Bulletin* , 28, 87-94.
12. Drosten, C., Gottig, S., Schilling, S., Asper, M., Panning, M., Schmitz, H., Gunther, S. (2002). Rapid Detection and Quantification of RNA of Ebola

- and Marburg Viruses, Lassa Virus, Crimean Congo Hemorrhagic Fever Virus, Rift Valley Fever Virus, Dengue Virus, and Yellow Fever Virus by Real-Time Reverse Transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology* , 40 (7), 2323-2330.
13. Endy, T., Chunsuttiwat, S., Nisalak, A., Libraty, D., Green, S., Rothman, A. (2002). Epidemiology of inapparent and symptomatic acute dengue virus infection: A prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet. *Journal of Epidemiology* , 156 (11), 40-51.
14. Gubler, D. (1996). Arboviruses as imported disease agents: The need for increased awareness. *Journal of Virology* , 11 (3), 21-32.
15. Gubler, D. (1998). Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clinical Microbiology Reviews* , 11 (3), 480-496.
16. Harris, E., Guy Roberts, T., Smith, L., Selle, J., D. Kramer, L., Valle, S. (1998). Typing of Dengue Viruses in Clinical Specimens and Mosquitoes by Single-Tube Multiplex Reverse Transcriptase PCR. *Journal of Clinical Microbiology* , 36 (9), 2634-2639.
17. Invitrogen, (2007), *Quant-iT™ RNA Assay Kits for use with the Qubit™ fluorometer*
18. Invitrogen, (2003), *SuperScript. III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase*
19. Johnson, B., Russell, B., Lanciotti, R. (2005). Serotype-Specific Detection of Dengue Viruses in a Fourplex Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay. *Journal of Microbiology* , 43 (10), 4977-4983.

20. Klungthong, C., Gibbons, R. V., Thaisomboonsuk, B., Nisalak, A., Kalayanarooj, S., Thirawuth, V., Nutkumhang, N., Mammen P., Jarman, R. (2007). Dengue Virus Detection Using Whole Blood for Reverse Transcriptase PCR and Virus Isolation. *Journal of Clinical Microbiology* , 45 (8), 2480-2485.
21. Kouri, P. (2006). *Instituto Pedro Kouri*. Retrieved Enero 15, 2008, from <http://www.ipk.sld.cu/bolepid2/bol12-06.htm>
22. Kung Wang, W., Ling Sung, T., Chen Tsai, Y., Liang Kao, C., Mei Chang, S., & Chuen King, C. (2002). Detection of Dengue Virus Replication in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Dengue Virus Type 2-Infected Patients by a Reverse Transcription-Real Time PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology* , 40 (12), 4472-4478.
23. Kung Wang, W., Nan Lee, C., Liang Kao, C., Ling Lin, Y., Chuen King, C. (2000). Quantitative Competitive Reverse Transcription-PCR for Quantification of Dengue Virus RNA. *Journal of Clinical Microbiology* , 38 (9), 3306-3310.
24. Lai, Y.-L., Chung, Y.-K., Tan, H.-C., Yap, H.-F., Yap, G., Ooi, E.-E., Ching, L. (2007). Cost-Effective Real-Time Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) To Screen for Dengue Virus followed by Rapid Single-Tube Multiplex RT-PCR for Serotyping of the Virus. *Journal of Clinical Microbiology* , 45 (3), 935-941.
25. Lanciotti, R., Kerst, A. (2001). Nucleic Acid Sequence-Based Amplification Assays for Rapid Detection of West Nile and St. Louis

- Encephalitis Viruses. *Journal of Clinical Microbiology* , 39 (12), 4506-4513.
- 26.Lanciotti, R., Calisher, C., Gubler, D., Jen Chang, G., Vorndam, V. (1992). Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology* , 30 (3), 545-551.
- 27.Lanciotti, R., Kerst, A., Nasci, R., Godsey, M., Mitchell, C., Savage, H., Komar, N., Panella, N., Allen, B., Volpe, K., Davis, B., Roehrig, J. (2000). Rapid Detection of West Nile Virus from Human Clinical Specimens, Field-Collected Mosquitoes, and Avian Samples by a TaqMan Reverse Transcriptase-PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology* , 38 (11), 4066-4071.
- 28.Laue, T., Emmerich, P., Schmitz, H. (1999). Detection of Dengue Virus RNA in Patients after Primary or Secondary Dengue Infection by Using the TaqMan Automated Amplification System. *Journal of Clinical Microbiology* , 37 (8), 2543-2547.
- 29.Liang Kao, C., Chuen King, C., Chao, D. Y., Wu, H. L., Chang, G. (2005). Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. *Journal of Microbiology and Immunology* , 38, 5-16.
- 30.Liao, C.-S., Lee, G.-B., Liu, H.-S., Hsieh, T.-M., & Luo, C.-H. (2005). Miniature RT-PCR system for diagnosis of RNA-based viruses. *Nucleic Acids Research* , 33 (18), 1-7.

31. Lindegren, G., Vene, S., Lundkvist, Å., Falk, K. (2005). Optimized Diagnosis of Acute Dengue Fever in Swedish Travelers by a Combination of Reverse Transcription-PCR and Immunoglobulin M Detection. *Journal of Clinical Microbiology* , 43 (6), 2850-2855.
32. Lizcano, F. (2004). *Fundamentos Moleculares en Medicina*. Bogotá : Manual Moderno.
33. Ludolfs, D., Schilling, S., Altenschmidt, J., Schmitz, H. (2002). Serological Differentiation of Infections with Dengue Virus Serotypes 1 to 4 by Using Recombinant Antigens. *Journal of Clinical Microbiology* , 40 (11), 4317-4320.
34. Luque, J., Herraiz, A. (2001). *Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética: Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud*. España: Hancourt.
35. Mamani, E., García, M., Gutiérrez, V., Cabezas, C., Harris, E. (2005). Tipificación molecular del virus dengue 3 durante el brote epidémico de dengue clásico en Lima, Perú, 2005. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* , 22 (3), 1-7.
36. Matheus, S., Meynard, J.-B., Lacoste, V., Morvan, J., Deparis, X. (2007). Use of Capillary Blood Samples as a New Approach for Diagnosis of Dengue Virus Infection. *Journal of Clinical Microbiology* , 45 (3), 887-890.
37. McPherson, M., Quirke, P., Taylor, G. (1991). *PCR 1: A practical approach*. Oxford: The practical approach series.

38. Mercado, R., Héctor, E., Tovar, R., Díaz, A., Camacho, M., Muñoz, M. (2006). The four serotypes of dengue recognize the same putative receptors in *Aedes aegypti* midgut and *Ae. albopictus* cells. *BMC Microbiology* , 6 (85), 1-10.
39. Miagostovich, M., Dos Santos, F., Gutiérrez, M., Riley, L., Harris, E. (2000). Rapid Subtyping of Dengue Virus Serotypes 1 and 4 by Restriction Site-Specific PCR. *Journal of Clinical Microbiology* , 38 (3), 1286-1289.
40. Morais Bronzoni, R., Baleotti, F., Ribeiro, R., Nunes, M., Luiz, M. (2005). Duplex Reverse Transcription-PCR Followed by Nested PCR Assays for Detection and Identification of Brazilian Alphaviruses and Flaviviruses. *Journal of Clinical Microbiology* , 43 (2), 696-702.
41. Morita, K., Tanaka, M., Igarashi, A. (1991). Rapid Detection of Dengue Virus Serotypes by Using Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology* , 29 (18), 2107-2110.
42. Murray, P., Baron, E., Jorgensen, J., Tenover, M., Tenover, R. (2003). *Manual of Clinical Microbiology* (octava edición ed.). Washington, DC: ASM press.
43. Paban, D., Man, P., Parag, S., Ajay, A., Singh, C., Tewari, K., Asha, J., Sekhar, K; Lakshmana, R. (2006). Reemergence of dengue virus type-3 (subtype-III) in India: Implications for increased incidence of DHF & DSS. *Virology Journal* , 3 (55), 2-10.

44. Persing, D. (2003). *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*. Washington, DC: ASM press.
45. Preeti, B., Harendra, C., Anubhav, P., Kavita, D., Lalit, D., Randeep, G., Sushil, K., Shobha B. (2008). Concurrent infections by all four dengue virus serotypes during an outbreak of dengue in 2006 in Delhi, India. *Virology Journal* , 5 (1), 1-5.
46. Prevention, C. f. (1989). Dengue Epidemic-Ecuador: Morbidity and Mortality Weekly report. *Centers for Disease Control and Prevention* , 24, 419-421.
47. Reynes, J. M., Ong, S., Mey, C., Ngan, C., Hoyer, S., Sall, A. (2003). Improved Molecular Detection of Dengue Virus Serotype 1 Variants. *Journal of Clinical Microbiology* , 41 (8), 3864-3867.
48. Rodriguez, M., Marzal, M. (2004). *Biolac*. Retrieved Enero 15, 2008, from http://www.biolac.unu.edu/PDF/BioM_Dengue.pdf
49. Singh, K., Lale, A., Ooi, E. E., Chiu, L.-L., Chow, V., Tambyah, P., Koay, E. (2006). A Prospective Clinical Study on the Use of Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction for the Early Diagnosis of Dengue Fever. *Journal of Molecular Diagnostics* , 8 (5), 613-616.
50. Surzycki, S. (1999). *Basic Techniques in Molecular Biology*. Bloomington: Springer.
51. Tavakoli, N., Tobin, E., Wong, S., Dupuis, A., Glasheen, B., Kramer, L., Bernard, K. (2007). Identification of Dengue Virus in Respiratory Specimens from a Patient Who Had Recently Traveled from a Region

- Where Dengue Virus Infection Is Endemic. *Journal of Clinical Microbiology* , 45 (5), 1523-1527.
- 52.Usawattanakul, W., Jittmittraphap, A., Endy, T., Nisalak, A., Tapchaisri, P., Looareesuwan, S. (2002). Rapid Detection of Dengue Viral RNA by Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA). *Dengue Bulletin* , 28, 125-129.
- 53.Vaughan, G., Olivera, H., Santos-Argumedo, L., Landa, A., Briseño, B., Escobar, A. (2002). Dengue Virus Replicative Intermediate RNA Detection by Reverse Transcription-PCR. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* , 9 (1), 198-200.
- 54.Winter, P. (2005). *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. UK: Belfast.
- 55.Wu, S.-J., Lee, E. M., Putvatana, R., Shurtliff, R., Porter, K., Suharyono, W., Watts, D., King, C. (2001). Detection of Dengue Viral RNA Using a Nucleic Acid Sequence-Based Amplification Assay. *Journal of Clinical Microbiology* , 39 (8), 2794-2798.
- 56.Xu, H., Di, B., Pan, Y.-x., Qiu, L.-w., Wang, Y.-d., Hao, W., He, L., Yuen, K., Che, X. (2006). Serotype 1-Specific Monoclonal Antibody-Based Antigen Capture Immunoassay for Detection of Circulating Nonstructural Protein NS1: Implications for Early Diagnosis and Serotyping of Dengue Virus Infections. *Journal of Clinical Microbiology* , 44 (8), 2872-2878.
- 57.Yábar, C., Carrillo, C., Nolasco, O., Montoya, Y. (1999). Diagnóstico temprano del Virus Dengue 1 usando RT-PCR y perspectivas para la

caracterización molecular de cepas autóctonas. *Medica Experimental* ,
15 (2), 31-34.

58. Yun Shu, P., Hsiung Huang, J. (2004). Current Advances in Dengue
Diagnosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* , 11 (4), 642-
650.

59. Yun Shu, P., Chang, S. F., Chung Kuo, Y., Yueh, Y. Y., Chien, L. J., Lin
Sue, C., Hsiang Lin, T., Hsiung-Huang, J. (2003). Development of Group
and Serotype Specific One Step SYBR Green I-Based Real-Time
Reverse Transcription-PCR Assay for Dengue Virus. *Journal of Clinical
Microbiology* , 41 (6), 2408-2416.

RESUMEN

La fiebre del dengue y la fiebre del dengue hemorrágico, afectan a 100 millones de personas por año, causando más de 20 000 muertes. Alrededor del mundo es considerada la enfermedad más importante de las transmitidas por artrópodos. En nuestro país, esta infección es más comúnmente encontrada en áreas tropicales y subtropicales, en donde ha adquirido distribución endémica.

El dengue puede ser diagnosticado por aislamiento viral o por pruebas serológicas, pero estos procedimientos requieren de mucho tiempo y generalmente se necesita aproximadamente una semana de incubación del virus. La detección de la enfermedad de manera rápida y confiable es muy importante para proporcionar adecuado manejo clínico a las personas afectadas.

El desarrollo de técnicas moleculares ha facilitado la introducción de diversos ensayos de diagnóstico rápido, como la RT-PCR para la detección de los virus de dengue. Esta técnica se efectúa rápidamente y es suficientemente sensible para la detección de los cuatro serotipos de dengue.

El objetivo de nuestro estudio fue desarrollar una RT-PCR para la rápida detección de estos virus, por lo que se optimizó, un sistema RT-PCR “en un solo paso”, que permite la identificación en un solo día de grupo y serotipo específico de dengue; esta técnica presenta ventajas sobre el diagnóstico convencional, las que incluyen rapidez, menor tasa de contaminación, mayor sensibilidad y fácil estandarización.

ABSTRACT

Dengue fever and Dengue hemorrhagic fever affect 100 million people per year, causing more than 20 000 deaths. Worldwide, it is considered to be the most important arthropod-borne disease. In our country the infection is most commonly found in tropical and subtropical areas and presents endemic distribution.

Dengue can be diagnosed by virus isolation or by serologic tests, but the procedure is time consuming and generally requires a week of virus incubation. Rapid and reliable case detection is important for clinical management of the disease.

The development of molecular techniques have facilitated the introduction of rapid diagnostic assays, like RT-PCR, for detection of dengue viruses. This technique is performed rapidly, and is sufficiently sensitive for the detection of all four dengue virus serotypes

The goal of our study was to develop a RT-PCR for the rapid detection of these viruses, so we optimized a one step RT-PCR system that can provide a same-day serotype-specific identification of dengue, this technique has advantages over conventional diagnosis including rapidity, lower contamination rate, higher sensitivity and easy estandarization.

ANEXO A

Protocolos probados para la extracción de RNA viral

1. Protocolo original

La extracción se realizó usando dos viales de 1.5 ml, cada uno de los cuales contenía 100 ul de muestra inicial.

Es fundamental el uso de controles de extracción.

1. Colocar 100 ul del cultivo en un vial de 1.5 ml y centrifugar a 5000 RPM durante 5 minutos
2. Descartar el sobrenadante
3. Colocar 600 ul de buffer RTL, para resuspender el pellet.
4. Pipetear el lisado directamente dentro de la columna QIAshredder y centrifugar durante 2 min. a máxima velocidad. Descartar la columna y conservar el tubo que contiene el líquido.
5. La mezcla obtenida colocarla cuidadosamente en la columna y guardar el producto homogenizado
6. Añadir 700 ul de etanol 70% y mezclar con la micropipeta.
7. Colocar la muestra dentro de de la columna QIAamp, centrifugar a 10000 RPM, 15 s. Descartar el tubo
8. Transferir la columna a un tubo de 2ml y colocar 700 ul de Buffer RW1 (buffer de lavado) en la columna QIAamp y centrifugar a 10 000 RPM por 15s. Descartar el tubo
9. Colocar la columna en un nuevo tubo de 2 ml y añadir el Buffer RPE. Centrifugar a 10 000 RPM, 15s. Descartar el tubo
10. Colocar la columna dentro de un nuevo tubo de 2ml y añadir 500 ul de buffer RPE, centrifugar a 14 000 RPM durante 3 min. Descartar el tubo.
11. Colocar la columna en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y agregar 30 – 50 ul de agua libre de RNasas; centrifugar a 10 000 RPM por 1 min. Descartar la columna
12. Almacenar el RNA obtenido a -80°C

2. Protocolo modificado

La extracción se realizó, usando dos viales de 1.5 ml, cada uno de los cuales contenía 200 ul de muestra inicial. Se utilizaron controles negativos

En este protocolo no se trabaja con el pellet viral sino con todo el cultivo

1. Poner 200 ul de cultivo del virus en el vial.
2. Colocar 600 ul de buffer RTL y mezclar.
3. Pipetear el lisado directamente dentro de la columna QIAshredder y centrifugar durante 2 min a máxima velocidad. Descartar la columna y conservar el tubo que contiene el líquido.
4. La mezcla obtenida colocarla cuidadosamente en la columna y guardar el producto homogenizado
5. Añadir 700 ul de etanol 70% y mezclar con la micropipeta.
6. Colocar la muestra dentro de de la columna QIAamp, centrifugar a 10000 RPM, 15 s. Descartar el tubo
7. Transferir la columna a un tubo de 2ml y colocar 700 ul de buffer RW1 (buffer de lavado) en la columna QIAamp y centrifugar a 10 000 RPM, por 15 seg. Descartar el tubo
8. Colocar la columna en un nuevo tubo de 2 ml, y añadir el buffer RPE, centrifugar a 10 000 RPM, por 15 seg. Descartar el tubo
9. Colocar la columna dentro de un nuevo tubo de 2 ml y añadir 500 ul de buffer RPE, centrifugar a 14 000 RPM durante 3 min. Descartar el tubo.
10. Colocar la columna en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y agregar 30 – 50 ul de agua libre de RNasas; centrifugar a 10 000 RPM por 1 min. Descartar la columna
11. Almacenar el RNA obtenido a -80°C

ANEXO B

Análisis de de temperatura de melting (Tm) y temperatura de annealing (Ta) de los primers usados para la optimizacion del método RT-PCR

$$Tm = 2 (A+T) + 4 (G+C)$$

$$Ta = Tm - (2^{\circ}C - 6^{\circ}C)$$

D1: 5' TCA ATA TGC TGA AAC GCG CGA GAA ACC G 3'

$$Tm = 2(14) + 4(14)$$

$$Tm = 84^{\circ}C$$

$$Ta = 78^{\circ}C - 82^{\circ}C$$

D2: 5' TTG CAC CAA CAG TCA ATG TCT TCA GGT TC 3'

$$Tm = 2(16) + 4(13)$$

$$Tm = 84^{\circ}C$$

$$Ta = 78^{\circ}C - 82^{\circ}C$$

TS1: 5' CGT CTC AGT GAT CCG GGG G 3'

$$Tm = 2(6) + 4(13)$$

$$Tm = 64^{\circ}C$$

$$Ta = 58^{\circ}C - 62^{\circ}C$$

TS2: 5' CGC CAC AAG GGC CAT GAA CAG 3'

$$T_m = 2(8) + 4(13)$$

$$T_m = 68^\circ\text{C}$$

$$T_a = 60^\circ\text{C} - 66^\circ\text{C}$$

TS3: 5' TAA CAT CAT CAT GAG ACA GAG C 3'

$$T_m = 2(13) + 4(9)$$

$$T_m = 62^\circ\text{C}$$

$$T_a = 56^\circ\text{C} - 60^\circ\text{C}$$

TS4: 5' CTC TGT TGT CTT AAA CAA GAG A 3'

$$T_m = 2(14) + 4(8)$$

$$T_m = 60^\circ\text{C}$$

$$T_a = 54^\circ\text{C} - 58^\circ\text{C}$$