

Implementación del diagnóstico de los serotipos del virus del dengue mediante PCR con transcriptasa inversa en tiempo real (RT-qPCR)

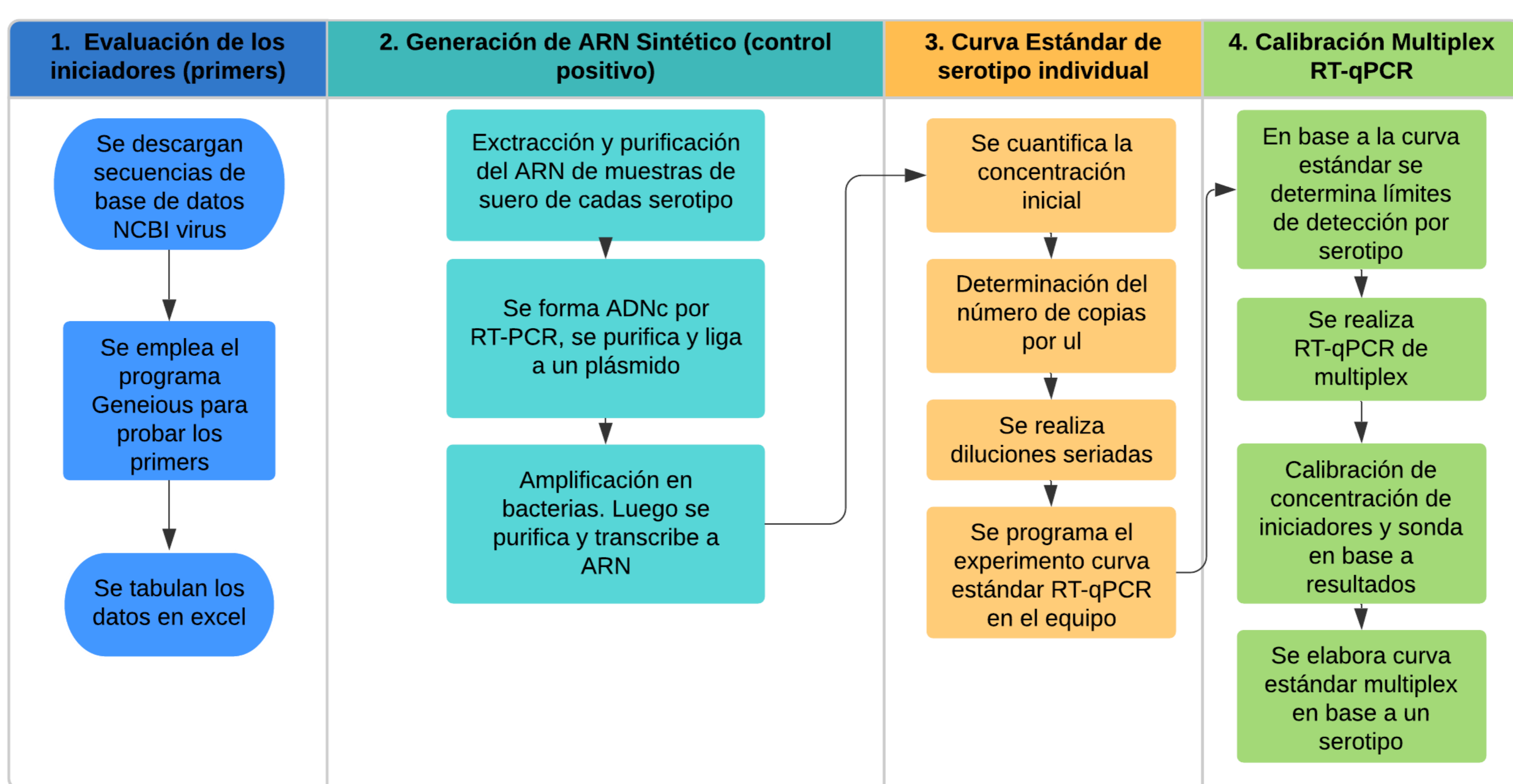
PROBLEMA

El dengue es una de las enfermedades transmitidas por vectores con gran número de casos, aproximadamente 100 millones de personas adquieren la enfermedad a nivel mundial. A nivel local, la provincia del Guayas presenta el mayor número de casos por año. La principal estrategia de detección en Ecuador es la prueba de antígenos/anticuerpos, pero no permite detectar serotipos ni ofrece eficaz detección temprana. Las pruebas moleculares superan esta barrera, pero son altamente costosas debido a que son importadas. Diversos estudios han demostrado que cada serotipo del virus del dengue exhibe en mayor medida síntomas específicos de la enfermedad, no obstante, en Ecuador el serotipado (identificación serotipos) de dengue no está disponible para diagnóstico común de sintomatología febril. Por ello, el desarrollo de metodologías locales costo-efectivas y sensibles para detección de serotipos del dengue son un reto para el sistema de salud en Ecuador.

OBJETIVO GENERAL

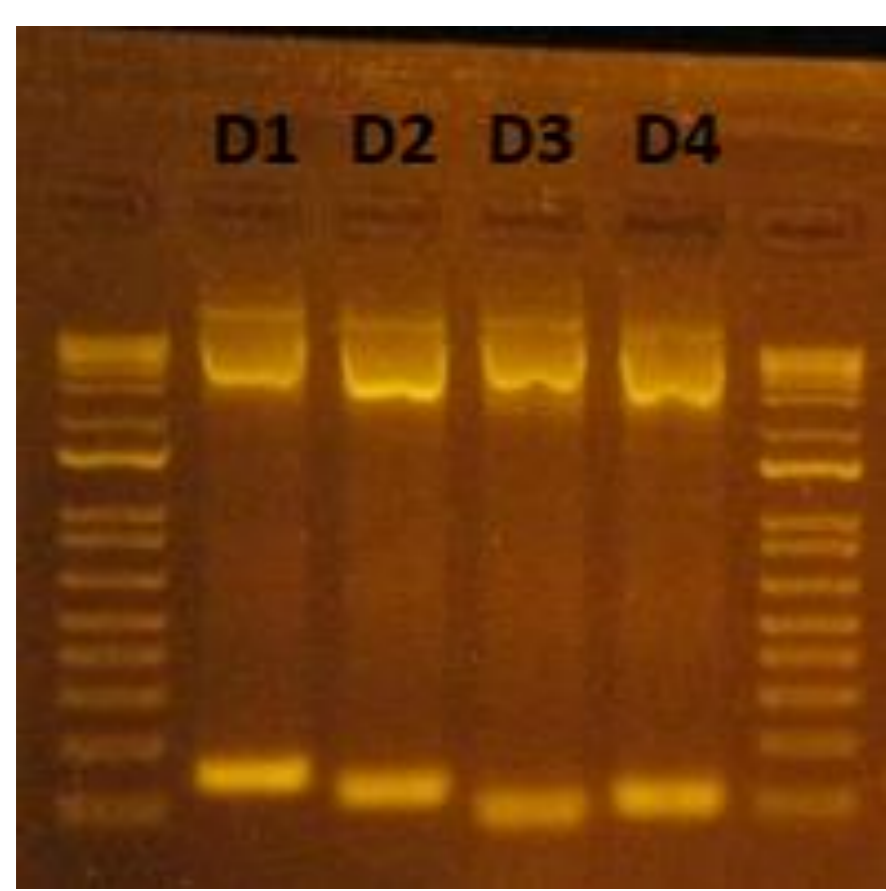
Desarrollar un protocolo estandarizado de serotipado de dengue (I-IV) basado en multiplex de PCR tiempo real (RT-qPCR) para implementación de paneles de diagnóstico local y seguimiento epidemiológico.

PROPUESTA



RESULTADOS

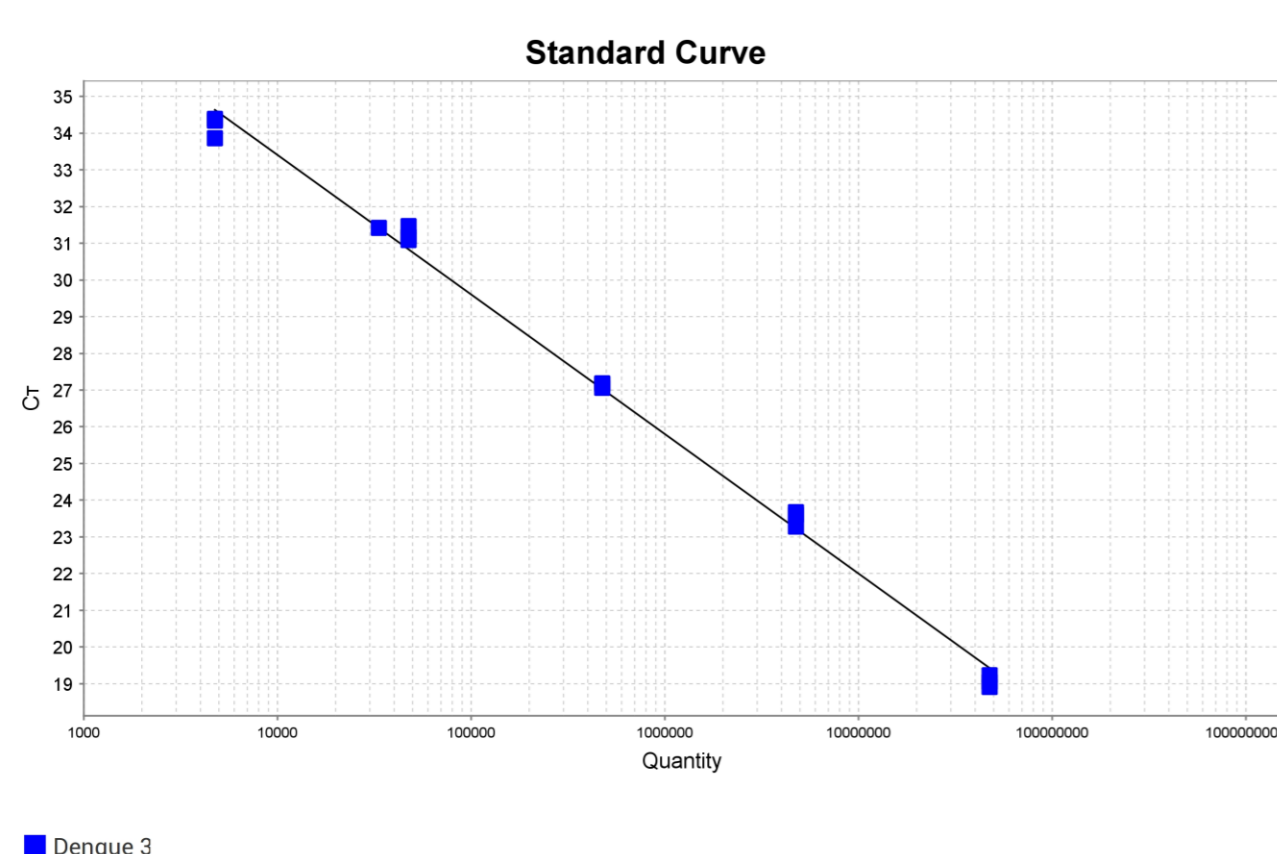
1 El análisis bioinformático mostró que algunos iniciadores presentaban un nucleótido diferente de la secuencia objetivo (denominado “mismatch”), sin embargo no representaba problema para anillarse en la PCR tiempo real.



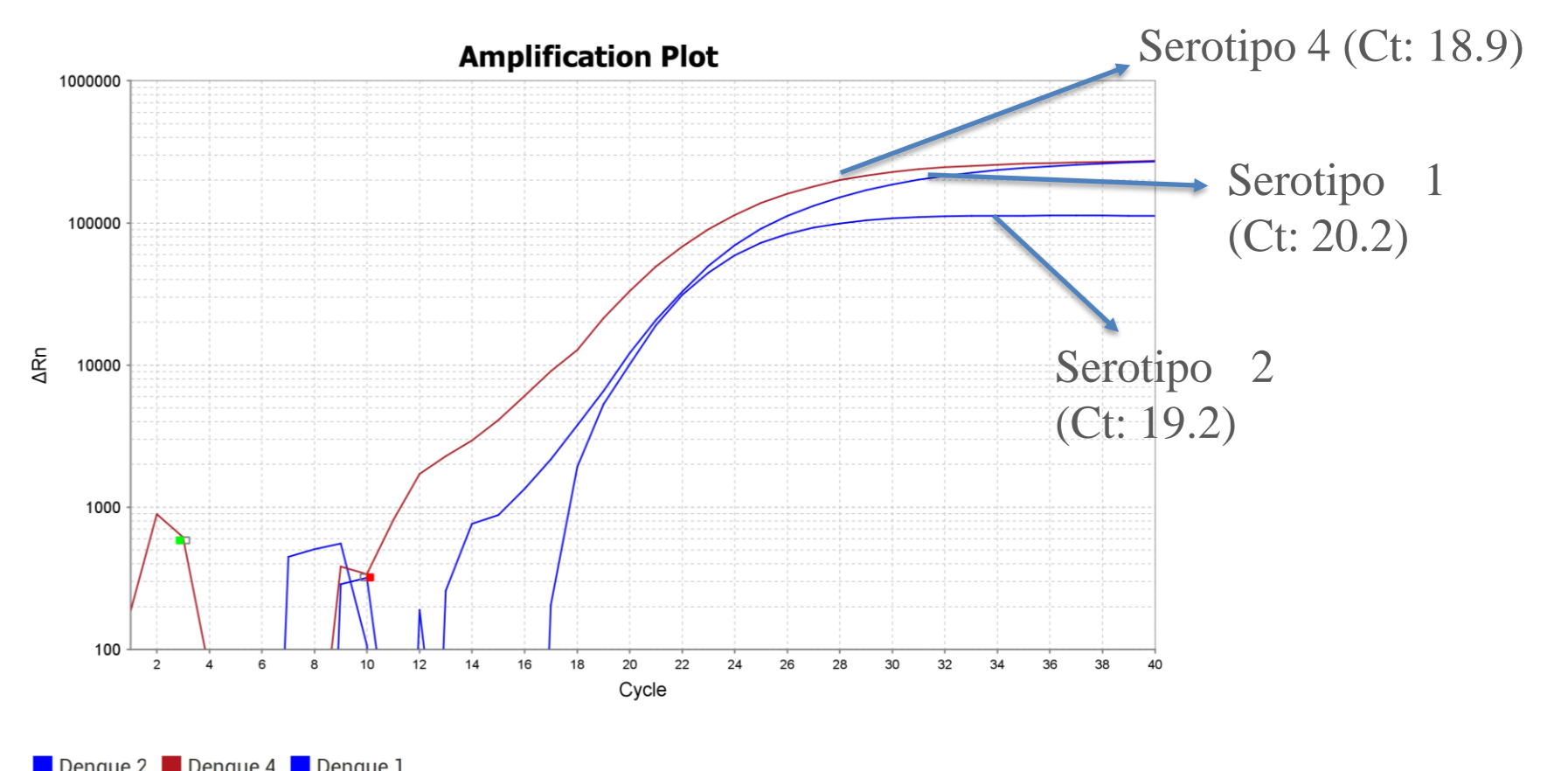
2 Como control de una efectiva síntesis de ARN, se empleó electroforesis donde los amplicones tuvieron el tamaño esperado. El ARN formado en los serotipos varió en concentración, sin embargo mantuvieron similar orden de magnitud de número de copias a excepción del Serotipo 1.

Código	Virus Dengue	Concentración de ARN formado (ng/ul)	Número de copias virales
D1	Serotipo 1	14	$3,58 \times 10^{10}$
D2	Serotipo 2	146	$6,23 \times 10^{11}$
D3	Serotipo 3	55,1	$1,87 \times 10^{11}$
D4	Serotipo 4	40,3	$1,79 \times 10^{11}$

3 Con respecto a la curva estándar, el tipo de experimento “Standard” en el termociclador Quantstudio 1 mostró mayor eficiencia que “Fast” (83.3% vs 75.4 %). La dilución 1:10000 del número de copias de los serotipos evidenció un valor de umbral de ciclos (Ct) adecuado (> 8 y < 35) sobre el cual se realizó pruebas de calibración. La interacción sonda de Serotipo 2 y 3 en PCR tiempo real mostró amplificación indeseada y por tanto, se siguen realizando procesos de calibración.



4 El valor de detección multiplex Serotipo 1, 2 y 4 no mostró diferencias significativas en contraste al ensayo individual, por tanto no se evidenció problemas asociados a interacción primers, sondas y ARN sintéticos. A un semejante número de copias virales, mantuvieron un Ct similar entre ellos. De esta manera, se pudo obtener la detección efectiva de tres serotipos en una sola reacción, basado en canales de medición de fluorescencia del termociclador empleado.



CONCLUSIONES

- La metodología multiplex (detectar varios objetivos en una reacción) supone una reducción importante en el costo de la prueba por muestra (aproximadamente entre 50 – 75%) al compararse con ensayos de detección individual por cada serotipo.
- Ensayos de interacción entre las sondas e iniciadores para el diagnóstico de los serotipos identifican problemas en desarrollo de ensayos multiplex y contribuye para la calibración.
- La elaboración de curvas estándar nos brinda evidencia de los límites de detección (número más bajo y alto de copias virales que se puede detectar) para cada serotipo, además de servir de control para la calibración del ensayo multiplex.
- Se obtuvo evidencia experimental que la multiplex de PCR en tiempo real obtenida en este proyecto basado en el protocolo propuesto es costo-efectiva en la detección de serotipos virales del dengue.