

DIAGNOSTICO RAPIDO DEL VIRUS DEL DENGUE POR ANALISIS MOLECULAR

Por Gonzalo Moratorio, Mariela Martínez, Macarena Álvarez, Lucía D'Andrea, Álvaro Fajardo, Ana Dubra, Ricardo Recarey y Juan Cristina*

Científicos del Laboratorio de Virología Molecular del Centro de Investigaciones Nucleares (CIN), perteneciente a la Facultad de Ciencias, participan de un proyecto para la implementación de una red regional de aseguramiento y control de la calidad de diagnóstico molecular e identificación de genotipos de parásitos que infectan al hombre, en particular el dengue.

El virus Dengue es el agente causal de una de las enfermedades de mayor prevalencia en varias regiones tropicales o sub-tropicales del mundo, incluida América Latina donde se ha vuelto endémico en los últimos 25 años. La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera al Dengue como una de las enfermedades emergentes más importantes y una de las principales enfermedades virales transmitidas al hombre por artrópodos, llamadas arbovirosis. Se estima que cerca de 2,5 billones de personas en el mundo están expuestas a contraer la enfermedad. (1)

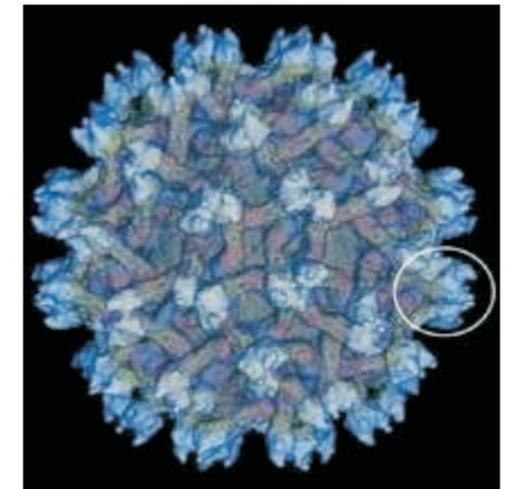
El dengue es una enfermedad viral transmitida por mosquitos. El vector principal es el *Aedes aegypty* (Ver características en pág. 6). El ciclo del virus involucra al mosquito y al ser humano exclusivamente, aunque existen estudios que señalan un posible huésped primate en Malasia.

Hay otro vector, el *Aedes albopictus*, ampliamente distribuido en Asia y algunas zonas del Pacífico, lugares donde trasmite el dengue. Este mosquito ha ingresado al continente y también a Uruguay, pero sin riesgo, por ahora, de transmitir el virus. (2)

El *Aedes aegypty* es también vector de otras enfermedades virales de gran importancia, tal como el virus de la Fiebre Amarilla. Debido a los brotes epidémicos de esta última enfermedad en los años '50 del siglo pasado, hubo una fuerte campaña de erradicación del vector, liderada por los servicios de salud de Estados Unidos de América, que permitió el control de la fiebre amarilla, y por consiguiente, del dengue en vastas regiones del continente americano. Lamentablemente, este fue el panorama hasta la década del '70, a partir de la cuál, al finalizar el énfasis puesto en esta campaña, el mosquito vuelve a colonizar

erupciones en la piel del tipo máculo papular. Posee una convalecencia duradera, con fatiga y depresión persistentes. La letalidad de este cuadro no complicado es muy baja.

La forma complicada de dengue hemorrágico se caracteriza por fiebre alta, fenómenos hemorrágicos, aumento del tamaño del hígado y shock. Esta presentación posee dos formas clínicas: dengue hemorrágico sin shock y síndrome de shock por dengue.



Virus del dengue - Fuente: Universidad de Purdue - EEUU

La presencia de dengue hemorrágico o del síndrome de shock parecen estar asociados a muchos factores, como ser características propias del huésped, la virulencia de la cepa viral y la respuesta inmunológica a la infección.

Los estudios realizados hasta el momento indican que existe un mecanismo de amplificación de la infección viral dependiente de los anticuerpos. Según estos, cuando un paciente es infectado por un segundo serotipo, distinto al primero que haya causado una infección pasada, las concentraciones de los anticuerpos, IgG, de la respuesta inmunitaria del paciente para el primer serotipo, facilitan la entrada del virus en las células huésped (monocitos, linfocitos, macrófagos), a través de sus receptores. (3) Sin embargo, existen también estudios que indicarían que la habilidad para causar una enfermedad severa en una primera infección varía entre los serotipos del virus del dengue y no debe descuidarse. (4)

Enfermedad

El dengue es producido por un flavivirus (familia de virus con estructuras similares, que incluye, además del virus del dengue, al virus de la fiebre amarilla, al virus del Nilo, de la hepatitis C y otros) que tienen formas diferentes y se clasifican, según su reacción con anticuerpos, en cuatro serotipos; 1, 2, 3 y 4. La enfermedad se caracteriza por un período de incubación de siete a diez días, seguido por un cuadro febril agudo de tres a cinco días de duración; acompañado de cefalea, dolores musculares y articulares, dolor retroorbital, anorexia, alteraciones gastrointestinales y

Por otra parte, se ha observado que anticuerpos del paciente que cursa una infección por virus dengue y que son los que se encuentran en los ensayos serológicos que se realizan en el laboratorio, pueden tener reactividad cruzada con otros miembros de la familia *Flaviviridae*, es decir, pueden deberse a otro virus de la misma familia, pero que no es dengue, lo que dificulta su diagnóstico certero. (6)

Si bien no ha sido posible establecer una clara relación entre un tipo particular de virus dengue, tanto por su serotipo, como por su genética, con la severidad de la enfermedad, algunos estudios indican que ciertos genotipos de virus tipos 2 y 3 están más asociados al dengue hemorrágico. (7)

Por todo lo que antecede, si bien han ocurrido importantes avances en la última década en relación con la biología del virus, el estudio de la partícula viral, sus proteínas, sus mecanismos de replicación, etc., la patogénesis causada por el dengue permanece como un verdadero rompecabezas, como una red compleja de factores virales y del huésped.

Diagnóstico de virus dengue

Debido a que no se cuenta con una vacuna efectiva ni tratamientos específicos contra el dengue, un diagnóstico certero y rápido es crítico, fundamentalmente para la toma de decisiones por parte de las autoridades de salud pública frente a una epidemia causada por este virus.

Los métodos de diagnóstico comúnmente usados para confirmar una infección causada por el virus del dengue involucran aislamiento viral del suero sanguíneo, plasma, leucocitos o tejido de autopsia del paciente; cuadruplicación o aumento mayor de la concentración de los anticuerpos IgG, o IgM, contra uno o varios antígenos del virus del dengue, en muestras de suero sanguíneo pareadas; detección del antígeno viral mediante prueba de inmunohistoquímica o inmunofluorescencia detección y ensayos de neutralización. Algunos de estos ensayos no pueden realizarse en Uruguay ya que exigen un cultivo de



Test de Elisa para análisis serológicos

virus, y dado que el dengue continúa siendo una enfermedad exótica deben observarse estrictas normas de bioseguridad.

El genoma del virus del dengue está constituido por una única molécula de ácido ribonucleico, ARN (la molécula que dentro de una célula cumple la función de transcribir y ejecutar las instrucciones del ADN) de polaridad positiva. Por consiguiente, la maquinaria necesaria para la replicación viral no va empacada junto a la partícula viral, como ocurre en otros virus. Una vez que el virus penetra en la célula, este genoma viral debe primero traducirse a todas las proteínas necesarias para reproducirse y producir una infección productiva. (8)

Recientemente, se han desarrollado métodos de diagnóstico rápido que permiten detectar la presencia del genoma viral en suero o plasma, mediante técnicas de amplificación del mismo, denominadas RT-PCR (reverse transcription-Polymerase Chain Reaction). Estas técnicas permiten obtener un resultado rápido, en menos de cinco horas, cuando las muestras de plasma o suero han sido tomadas dentro de los primeros cinco días, a partir del inicio de los síntomas, o sea mientras persiste el virus en el paciente, y se hayan almacenado correctamente para su posterior análisis.

Acontecimientos sanitarios destacables Vinculados a mosquitos en Uruguay (2)

- 1873 - Última epidemia de fiebre amarilla en Montevideo.
- 1916 - Última epidemia de dengue en Uruguay, Salto, Canelones y Montevideo.
- 1947 - Uruguay se integra al Plan Continental de eliminación de *Aedes aegypti*.
- 1958 - Uruguay certifica eliminación de *Aedes aegypti*.
- 1997 - Uruguay se reinfecta con *Aedes aegypti*.
- 2003 - Uruguay se infesta con *Aedes albopictus*.
- 2006 - Uruguay permanece como el último país de América, colonizable por *Aedes aegypti*, libre de dengue en todo su territorio.

Distribución de *Aedes aegypti* en las Américas en 1970 al finalizar la campaña de erradicación del mosquito y en el año 2002 (fuente: OMS)



En materia de stress ambiental motivado por mosquitos ocurren invasiones de *Ochlerotatus albifasciatus* en los meses de verano (enero o febrero) en el área costera del Río de la Plata y el Océano Atlántico.

En ciudades del interior del país, invasiones similares son protagonizadas por diferentes géneros de mosquitos, originarios de las áreas perifluviales de ríos y arroyos cercanos a ciudades y pueblos de distintos departamentos.

Proyecto ARCAL

El laboratorio de virología del Centro de Investigaciones Nucleares (CIN), perteneciente a la Facultad de Ciencias, participa de un proyecto ARCAL para la implementación de una red regional de aseguramiento y control de la calidad de diagnóstico molecular e identificación de genotipos de parásitos que infectan al hombre, vectores y reservorios, junto a laboratorios de Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Perú y Panamá, proyecto que tiene como uno de los objetivos principales el virus del dengue.

ARCAL es un acuerdo (Acuerdo Regional de Cooperación para la Promoción de la Ciencia y la Tecnología Nucleares en América Latina y el Caribe), del Organismo Internacional de Energía Atómica, que proporciona un marco de referencia para los Estados miembros en América Latina y el Caribe que quieran intensificar su colaboración a través de programas y proyectos centrados en necesidades específicas compartidas por dichos miembros. Se estableció en 1984, y en 1998 se formalizó como un acuerdo intergubernamental.

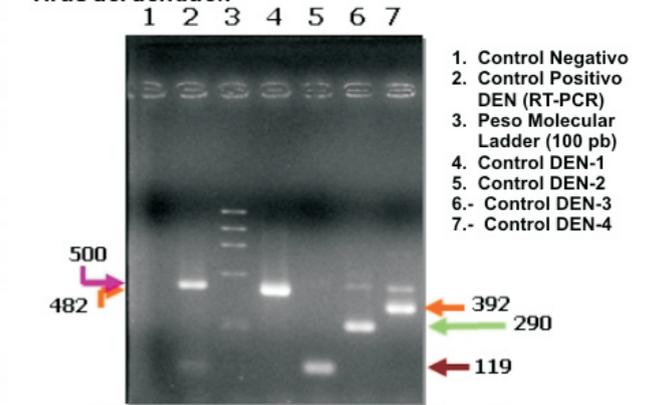
En este proyecto, el laboratorio de virología uruguayo ha tenido una activa participación en investigación y desarrollo, así como en actividades docentes. Esto ha permitido a los científicos uruguayos poner a punto las técnicas de RT-PCR, específicas para virus del dengue, donde se pueden realizar los análisis desde enero de 2006. Además les ha posibilitado trabajar estrechamente con colegas de Perú y Ecuador en el diagnóstico molecular rápido de virus dengue y en el aseguramiento de la calidad de los resultados obtenidos por métodos moleculares. En estos momentos, a partir de estudios realizados por uruguayos y peruanos tanto en Lima como en Iquitos, en la selva amazónica peruana, se pueden hacer los primeros análisis de variabilidad genética de estirpes del virus del dengue que circulan en Ecuador. Además, el trabajo conjunto realizado en el Instituto Nacional de Salud de Lima, Perú, ha permitido formar jóvenes investigadores uruguayos en técnicas de diagnóstico molecular de dengue.

Perspectivas

Recientemente, se detectó en el Departamento de Salto un probable brote epidémico de virus del dengue, ausente en Uruguay hasta este momento. A raíz de estos hechos, la Sra. Ministra de Salud Pública, Dra. María Julia Muñoz, solicitó al Sr. Decano de la Facultad de Ciencias, Prof. Julio Fernández, toda la colaboración posible por parte de la institución. Por consiguiente, toda la experiencia y la infraestructura del Laboratorio de Virología Molecular del CIN fue puesta a disposición para colaborar con el Ministerio de Salud Pública.

* **El Laboratorio de Virología Molecular está integrado por el Dr. Juan Cristina, Profesor Agregado Grado 4 del Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, quién lo dirige. Trabajan junto con él, en el laboratorio de virología: el Dr. Rodney Colina, que en el momento está haciendo un postdoctorado en Mac Gill University, Montreal; Pilar Moreno, estudiante de Doctorado de PEDECIBA,**

Lilia López estudiante de Maestría por PROINBIO, programa de la Facultad de Medicina, (todos los cuales se especializan en el estudio del virus de la Hepatitis C); la Dra. Laura García, que se encuentra en Viena en la OIEA (Organismo Internacional de Energía Atómica) (se especializa en el virus de la hepatitis A) Gonzalo Moratorio, estudiante de Magister, con beca de PEDECIBA (se ha especializado en el diagnóstico y epidemiología molecular de virus Dengue, tanto en Uruguay, como en Lima e Iquitos, Perú); Mariela Martínez, licenciada en Ciencias Biológicas; y Macarena Álvarez, Lucía D'Andrea, Álvaro Fajardo, Ana Dubra y Ricardo Recarey, estudiantes de la licenciatura de Ciencias Biológicas, haciendo su pasantía curricular en el laboratorio, (colaboran en el estudio del virus del dengue).



Diagnóstico molecular de virus Dengue

En la figura se muestra el resultado del ensayo realizado mediante técnicas de RT-PCR. La ubicación de la banda (determinada por el tamaño en pares de bases) permite determinar el serotipo de virus dengue en un paciente.

Referencias:

- 1) PAHO, Pan American Health Organization. (2000). Dengue in the Americas: the epidemic of 2000. *Epidemiological Bulletin* 21(4)
- 2) Henchal, EA y Putnuk, JR. (1990) The Dengue viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 3,376-396.
- 3) Fuente: *Culicidos y salud humana en el Uruguay*. Dr. Roberto Salvatella (Consultor en enfermedades transmisibles para Uruguay de la Organización Panamericana de la Salud) y Dra. Raquel Rosa (Directora de Epidemiología del Ministerio de Salud Pública). <http://www.ugf.br/editora/revistas/entomologia/eyv2003/art1.pdf>
- 4) Anderson, R. (2003). Manipulation of cell surface macromolecules by flaviviruses. *Adv. Virus Res.* 59, 229-274 y Bielefeldt-Ohmann, H. (1997) Pathogenesis of dengue virus diseases: missing pieces in the jigsaw. *Trends in Microbiology* 5, 409-413.
- 5) Balmaseda, A, Hammond, SN, Perez, L., Tellez, Y., Saborio, SI, Mercado, JC, Cuadra, R, Rocha, J, Perez, MA, Silva, S., Rocha, C. & Harris, E. (2006). Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 74, 449-456.
- 6) Nawa M, Yamada KI, Takasaki T, Akatsuka T, Kurane I. (2000). Serotype cross-reactive immunoglobulin M responses in dengue virus infections determined by enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology* 7, 774-777.
- 7) Messer, WB, Gubler, DJ, Harris, E, Sivananthan, K & de Silva, AM. (2003) Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 800-809.
- 8) Salonen, A., Ahola, T & Kaariainen, L. (2005). Viral RNA replication in association with cellular membranes. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 285, 139-173.

Aedes aegypti

Es un mosquito cuyo origen se ubica en la región etiópica. Desde allí inició una dispersión efectuada por el hombre, por medio del transporte de sus adultos, huevos, larvas o ninfas en barcos, transportes terrestres e incluso aviones, que lo ha llevado a constituirse en un mosquito cosmopolita. Su presencia es detectada en la mayor parte de las áreas tropicales o subtropicales, comprendidas entre los 45° de latitud norte y los 35° de latitud sur.

El *Aedes aegypti* fue reintroducido al Uruguay, primero desde Argentina, en 1997, y posteriormente de Brasil. Fue detectado por la vigilancia entomológica del Ministerio de



Salud Pública y las Intendencias Municipales tempranamente, lo que determinó la ganancia de un tiempo útil de vigilancia y control que ha restringido su infestación a pocas ciudades y departamentos. El control ejercido con grandes limitaciones de recursos, practicado a partir de un alerta temprano y oportuno, ha redundado en que Uruguay sea el último país de la Américas sin transmisión autóctona de dengue, en la totalidad de su territorio

Aedes albopictus,

Es otra especie del mismo subgénero que el *Aedes aegypti*, *Stegomyia*. Ha sido introducida recientemente en América, su origen es Asia y Oceanía, donde ancestralmente protagoniza la transmisión de dengue.

La llegada a Uruguay de *Aedes albopictus*, desde Brasil, en el año 2003, sólo fue una cuestión de tiempo con la infestación de Río Grande del Sur por el mismo. Por ahora este vector no registra riesgo de transmisión.

En este caso, otra vez la vigilancia entomológica logró detectar las primeras infestaciones con total oportunidad en las ciudades de Artigas y Rivera.

Biología de la especie



El mosquito *Aedes aegypti* establece sus criaderos en agua limpia, con bajo tenor orgánico y con baja concentración de sales disueltas, la que encuentra en depósitos de agua ubicados en objetos o construcciones, como neumáticos, baterías viejas, recipientes de todo tipo, botellas, floreros y piletas, entre otros, que se encuentran en las viviendas de humanos o sus alrededores. Pone los huevos en la superficie del recipiente a la altura de la interfase agua-aire.



Los huevos, menores al milímetro de largo, son inicialmente de color blanco, para tornarse negros con el desarrollo del embrión, que evoluciona en óptimas condiciones de temperatura y humedad, en un lapso de dos a tres días. Pasado esta etapa, los huevos son capaces de resistir la desecación y temperaturas extremas llegando a sobrevivir un tiempo entre siete meses a un año y luego pueden eclosionar tras unos cuatro días de humedad.



El desarrollo de las larvas se completa en condiciones favorables de nutrición (fitoplancton del agua) y con temperaturas de 25° a 29°C, en unos cinco a siete días. Son incapaces de resistir temperaturas inferiores a 10°C ni superiores a 44° o 46°C.

La pupa no requiere alimentación y, en temperaturas entre 28° y 32°C, completa su desarrollo hasta la emergencia del adulto en uno, dos o tres días. Las variaciones extremas de temperatura pueden dilatar este período. El ciclo completo de *Aedes aegypti*, de huevo a adulto, se completa en óptimas condiciones de temperatura y alimentación, en diez días.



El adulto es un mosquito de color negro, con diseños plateados o amarillo blanquecino formados por escamas claras que se disponen simulando la forma de una "lira" en el dorso del tórax. Las patas están bandeadas y el último artejo de las patas posteriores es blanco. El abdomen de la hembra tiende a ser puntiagudo.

Las hembras se alimentan de sangre de donde obtienen proteínas para sus huevos, lo hacen normalmente de día, en cercanía a los domicilios humanos, con gran afinidad por el ser humano.

En el caso de tomar sangre infectado por el virus del dengue (lo que puede ocurrir por alimentarse de sangre de un enfermo durante el tiempo de infección virósica, la que comienza un día antes del inicio de la fiebre y se extiende hasta el sexto u octavo día de la enfermedad) el virus se replica en el intestino del mosquito, ganglios nerviosos, cuerpo graso y glándulas salivales, y permanece infectado toda su vida, que pueden durar semanas o meses, en condiciones de hibernación. Luego de una semana o dos puede infectar a un ser humano por picadura.