

E

EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y DETECCIÓN MOLECULAR DEL GENOMA DE DENGUE TIPO 2 EN MOSQUITOS *Aedes aegypti*

Liotta, D. J. / Cabanne, G. S. / Tonon, S. A.
Laboratorio de Biología Molecular Aplicada
Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales - U.Na.M.
Felix de Azara 1552, Posadas, Misiones, (3300) Argentina.
E-mail: tonon@arnet.com.ar

EXTRACTION, PURIFICATION AND MOLECULAR DETECTION OF DENGUE TYPE 2 GENOME IN
MOSQUITOES *Aedes aegypti*

ABSTRACT

This work describes a reliable protocol for the extraction, purification and detection of Dengue type 2 viral RNA from infected *Aedes aegypti* mosquitoes by RT-PCR. The entire process takes about 12 hours with a detection limit of 2×10^4 PFU/ml. This proposed method can also be applied to the detection of the other three Dengue virus serotypes in mosquitoes and infected human serum samples with the sole inclusion of type specific primers.

KEY WORDS: flaviviruses, Dengue viruses, RT-PCR, viral RNA, *Aedes aegypti*.

RESUMEN

El presente trabajo describe un protocolo útil para la extracción, purificación y detección del genoma del virus del Dengue serotipo 2 a partir de mosquitos vectores *Aedes aegypti* infectados mediante RT-PCR. El proceso completo insume aproximadamente 12 horas, con un límite de detección establecido de 2×10^4 UFP/ml. Esta metodología es extensiva a los otros tres serotipos virales del Dengue reemplazando los cebadores tipo específicos y puede utilizarse para la tipificación viral en muestras de suero humano.

PALABRAS CLAVES: flavivirus, virus del Dengue, RT-PCR, ARN viral, *Aedes aegypti*.

La Fiebre del Dengue (FD) y la Fiebre Hemorrágica del Dengue (FHD) son causadas por la infección con cualquiera de los cuatro serotipos del virus del Dengue (VD), pertenecientes a la Familia Flaviviridae. Esta enfermedad reviste un interés particular por su alcance social y económico en sus estados endémicos y episodios epidémicos [14]. La sintomatología presenta dos formas: fiebre moderada autolimitada en la FD, o una más severa: la FHD, con anomalías vasculares y hemostáticas que puede evolucionar en síndrome de colapso, con una alta tasa de mortalidad [12, 15].

El VD es transmitido principalmente por el mosquito *Aedes aegypti*, el cual se cría en recipientes domiciliarios y peridomiciliarios sujetos a fluctuaciones pluviales. En el continente americano la expansión de la noxa a otras áreas geográficas está sujeta a cambios ecológicos y etológicos humanos, los que favorecen el desarrollo de este vector [6].

La prevención y control de brotes epidémicos se sustenta principalmente en la vigilancia epidemiológica del vector *Aedes aegypti* y en los casos clínicos declarados. Un sistema de vigilancia constante permite la implementación de medidas de acción directa como son el uso de insecticidas y la destrucción del hábitat de la población larvaria [14]. Sin embargo, el monitoreo de poblaciones de mosquitos adultos y larvas con densidad poblacional baja no es un indicador sensible para la prevención de brotes epidémicos. Por ello, la detección de la presencia de VD en poblaciones del vector constituye un complemento valioso a la vigilancia activa y alerta temprana de potenciales brotes [3].

La falta de vacunas y de campañas de erradicación globalizadas, hacen del desarrollo de sistemas de vigilancia basados en técnicas rápidas de laboratorio, el único camino actualmente viable para generar una alerta temprana sobre potenciales epidemias por FD. El vector debe ser controlado esté o no infectado [7].

Un importante factor de riesgo necesario para el desarrollo de la forma severa FHD-SSD es la infección con un serotipo heterotípico, suceso que acontece cuando circula un nuevo serotipo viral o cocirculan dos serotipos virales. Así, la tipificación viral adquiere un carácter prioritario, nece-

sitándose para ello metodologías rápidas, sensibles y específicas [13].

La técnica tradicional de tipificación viral se basa en el aislamiento del agente viral mediante cultivo celular en líneas establecidas (i.e.: C6/36) seguido de inmunofluorescencia indirecta [5, 17, 18], o bien mediante su detección por neutralización [1]. Indistintamente de cuál de estas técnicas clásicas sea la utilizada, ambas presentan como principales desventajas el tiempo requerido para su realización y su costo asociado.

Como alternativa, el análisis basado en técnicas moleculares de amplificación de ácidos nucleicos in vitro (RT-PCR y PCR) ofrece un método rápido, sensible y específico para la detección y tipificación viral [9, 10]. Además, planteando un correcto diseño experimental, estas metodologías presentan una relación costo-beneficio aceptable para países en vías de desarrollo [8].

En el presente trabajo se presenta un protocolo experimental útil para la extracción, detección y tipificación del genoma viral del Dengue en mosquitos infectados, basado en los trabajos de Lanciotti *et al.* (1992) y Harris *et al.* (1998). El empleo de esta metodología en estudios epidemio-lógicos permite detectar la infección del vector, elemento primario en la historia natural de la enfermedad, y evaluar las condiciones potenciales de transmisibilidad a humanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa viral y títulos virales

La cepa viral empleada como patrón fue caracterizada como serotipo 2, subtipo III, Brazilian strain [11], gentilmente cedida por el Laboratorio de Flavivirus del Instituto Oswaldo Cruz (Río de Janeiro, Brasil).

El título viral fue obtenido mediante el ensayo de placas. Células BHK21-15 crecidas hasta un 90 a 95% de confluencia se inocularon por duplicado con 200 μ l de diluciones seriadas del stock viral. Después de 2 horas a 37°C se cubrió la monocapa celular con agarosa al 1% conteniendo medio esencial mínimo enriquecido con 5% de suero fetal bovino, y se incubó 7 días a 37°C con un 5% de CO₂. Las células se fijaron con solución de formaldehído por 2 horas y se colorearon con una solución de rojo neutro al 0.3%.

Mosquitos

Los ejemplares adultos de mosquitos *Aedes aegypti* utilizados fueron obtenidos a partir de larvas de tercer o cuarto estadio capturadas en distintos relevamientos realizados en la ciudad de Posadas, provincia de Misiones, Argentina. La clasificación taxonómica de los mismos se llevó a cabo en colaboración con la Cátedra de Ecología I de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones. Debido a la ocurrencia esporádica del fenómeno de transmisión transovárica del VD no se utilizaron adultos capturados a campo [16].

Muestras analíticas

Ensayos de extracción y purificación de genoma viral. Se utilizaron muestras puras de VD tipo 2 (1×10^5 UFP/ml) resuspendidas en 100 μ l de *buffer* fosfato salino estéril, pH 7,8.

Análisis del posible efecto inhibitorio del material orgánico del vector. Considerando el posible efecto inhibitorio sobre las reacciones de amplificación molecular por material orgánico dependiente del número de mosquitos presentes en cada muestra analítica, se fijaron lotes de 1, 20 y 50 cabezas de *Aedes aegypti*, a los cuales se dispensó 1×10^5 UFP/ml de cepa viral patrón.

Extracción y purificación del ARN viral

Cada lote de cabezas de mosquito fue macerado en micromortero con 100 μ l de *buffer* de lisis (isotiocianato de guanidinio 6 M, citrato de sodio 50 mM, Sarkosyl 1%, RNAt de *E. coli* 20 μ g/ml, β -mercaptoetanol 100 mM, pH 5,5-6,0), homogeneizándolo por inversión durante 10 minutos. El sobrenadante de interés fue separado de la quitina cefálica del vector mediante centrifugación [9].

La purificación del ARN viral se realizó por doble extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 25:24:1. Para la extracción del mismo se dispensaron 5 μ l de partículas de sílica con tratamiento ácido a la fase acuosa de cada muestra, incubándose la mezcla por 5 minutos a temperatura ambiente. El sedimento de sílica fue lavado posteriormente con 200 μ l de *buffer* compuesto por 50% de etanol, Tris-ClH 10 mM pH 7,4 y 50 mM ClNa. Finalmente, cada sedimento se resuspendió en 15 μ l de agua libre de nucleasas, 5 mM ditiotreitol (DTT) y 1 U/ μ l RNaseOUT™

(GIBCO BRL), se incubó durante 5 minutos a $50^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, empleándose una alícuota de 2,5 μ l del sobrenadante para la reacción de RT-PCR.

Transcripción reversa (RT-PCR)

La reacción de RT-PCR es una modificación de las metodologías presentadas por Lanciotti *et al.* (1992) y Harris *et al.* (1998), empleándose en este caso como única enzima la *rTth pol* (Promega) de *Thermus thermophilus* para la síntesis de la primera y segunda cadena de ADN, como también para la PCR genérica posterior.

La mezcla de reacción para la RT contenía para un volumen final de 10 μ l, 10 mM Tris-ClH pH 8,3, 90 mM ClK, 1 mM Cl₂Mn, 200 μ M de cada uno de los cuatro desoxinucleótidos trifosfatos, 5 mM DTT, 2 U/ μ l RNaseOUT™ (GIBCO BRL), 1 pmol/ μ l del cebador D2 (TTG CAC CAA CAG TCA ATG TCT TCA GGT TC), y 0,25 U/ μ l de *rTth pol* (concentración final de 0,05 U/ μ l en la PCR genérica).

La reacción de RT se llevó a cabo en un ciclador Techne PHC3 a 60°C durante 30 minutos. Posteriormente, a cada tubo se agregó la mezcla de reacción de PCR genérica: *buffer* quelante (10 mM Tris-ClH pH 8,3, 0,1 M ClK, 0,75 mM EGTA, 0,05% Tween®20, 5 % glicerol), 1 mM Cl₂Mg, 200 μ M de cada uno de los cuatro desoxinucleótidos trifosfatos, 1 pmol/ μ l del cebador D2, y 1 pmol/ μ l del cebador D1, (TCA ATA TGC TGA AAC GCG CCA GAA ACC G) para un volumen final de 50 μ l, seguido por 40 ciclos de amplificación de 94°C 45 seg., 55°C 45 seg., 72°C 60 seg., con una extensión final a 72°C durante 10 minutos.

PCR "seminested" tipoespecifica

Se tomaron 10 μ l de la reacción de PCR genérica y se agregaron a un volumen de reacción final de 50 μ l, 50 mM ClK, 10 mM Tris-ClH pH 8,4, 0,01% Triton® X-100, 4,5 mM Cl₂Mg, 200 μ M de cada uno de los cuatro desoxinucleótidos trifosfatos, 1 pmol/ μ l de los cebadores D1 y TS2 (CGC CAC AAG GGC CAT GAA CAG). Luego de un inicio *hot start* a 80°C durante 3 minutos, se dispensaron 1,5 U/ μ l de la enzima *Taq pol* de *Thermus aquaticus* y se sometió la reacción a 35 ciclos de 94°C 30 seg., 68°C 45 seg., 72°C 45 seg., con una extensión final a 72°C durante 5 minutos.

Los productos de amplificación generados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y teñidos con 0,5 µg/ml bromuro de etidio. Una banda única de aproximadamente 120 pb indicó positividad para genoma viral de Dengue tipo 2.

Confirmación de la especificidad de reacción

Para validar que el producto de aproximadamente 120 pb obtenido por PCR correspondía inequívocamente al esperado de la amplificación de la región 5' no codificante (5'NC) del genoma del VD tipo 2, se realizaron dos experimentos adicionales independientes: como control positivo a) una restricción enzimática con la enzima *Hinc II* cuya acción sobre el amplicón específico produce dos fragmentos de restricción de 85 pb y 35 pb respectivamente; y como control negativo b) una PCR multiplex empleando 1 pmol/µl del primer TS1 (CGT CTC AGT GAT CCG GGG G) que genera un producto de 482 pb específico para el VD serotipo 1.

Determinación del límite de detección del método

El límite práctico de detección del método desarrollado se evaluó partiendo de lotes analíticos con 1, 20 y 50 cabezas de mosquitos conteniendo diversas concentraciones de partículas virales en el rango de 2×10^4 a 1×10^5 UFP/ml. Este rango se estimó considerando: a) la información existente para VD serotipo 3 [9]; y b) el número de partículas virales promedio encontradas en mosquitos *Aedes aegypti* infectados a campo (2×10^4 - 1×10^5 UFP/ml) (20).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción y purificación de genoma viral

El protocolo de extracción y purificación de genoma viral del Dengue serotipo 2 consiste en una modificación del ensayo propuesto por Harris *et al.* (1998). Los principales cambios implementados fueron el uso de isotiocianato de guanidinio y solventes orgánicos en el proceso de extracción y purificación del genoma viral, y el de partículas de sílica con tratamiento ácido para concentrarlo como alternativa a la precipitación etanólica, acelerando considerablemente los tiempos de extracción [2, 4].

De todos los lotes analizados se recuperó genoma viral, con una ligera incidencia del número de cabezas de mosquitos presentes en cada lote sobre la cantidad y calidad del genoma obtenido, observándose menor rendimiento extractivo en los lotes con mayor cantidad de cabezas (Figura 1).

Detección por RT-PCR y tipificación viral

El proceso de detección se realizó en dos etapas [10]: una RT-PCR genérica y una PCR *seminested* tipoespecífica. El empleo de la enzima *rTth pol* en lugar de otras retrotranscriptas aporta la posibilidad de amplificación genérica con la misma enzima en presencia del cocatión Mg^{++} además de una disminución en el tiempo total de reacción.

Para la PCR *seminested* tipoespecífica se empleó una elevada concentración de Mg^{++} (4,5 mM) y una alta temperatura de hibridación de los cebadores (68°C), lo que evitó la frecuente generación de bandas inespecíficas de mayor peso molecular a la esperada, probablemente originadas por la secuencia génica particular de la cepa utilizada como patrón [19].

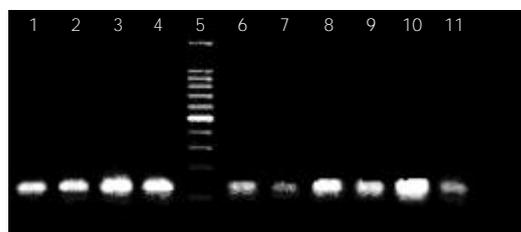


FIGURA 1: detección y tipificación por RT-PCR del virus del Dengue tipo 2 a partir de muestras de *Aedes aegypti*. Calles 1 a 4 y 6 a 9, muestras con 0, 1, 20 y 50 mosquitos, diluciones 1/10 y 1/50 del producto de amplificación genérico, respectivamente. Calles 10 y 11, control (+) y (-) de PCR tipoespecífica. Calle 5 escalera de 100 pb y Calle 11 producto de 120 pb tipoespecífico.

Especificidad y sensibilidad de la reacción

El límite de detección obtenido fue de 2×10^4 UFP/ml, si bien la intensidad de la señal disminuyó con el número de cabezas de mosquitos (Figura 2). En los muestreos a campo de mosquitos adultos, aproximadamente el 80% de los lotes están conformados por 1 a 5 mosquitos (datos propios del grupo de investigación), y la carga viral en vectores infectados durante la estación húmeda es en promedio de 1×10^5 UFP/ml [20]. De este modo, el límite de detección alcanzado aseguraría

la detección molecular con un alto grado de certeza.

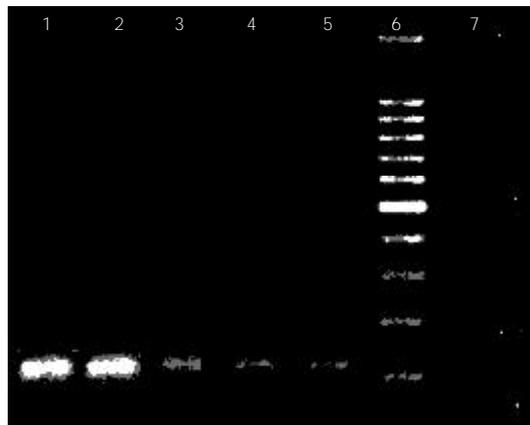


FIGURA 2: determinación del límite de detección por RT-PCR del VD tipo 2 a partir de muestras de *Aedes aegypti* infectadas en laboratorio. Calles 2 a 5, muestras con 0, 1, 20 y 50 mosquitos, respectivamente. Calle 1 y 7, control (+) y (-), respectivamente. Calle 6, escalera de 100 pb.

Cuando la reacción de PCR fue llevada a cabo solamente con el cebador TS1 específico para genoma viral de Dengue tipo 1, no se detectó señal; mientras que cuando se ensayó una PCR multiplex con cebadores TS1 y TS2 utilizándose genoma viral del VD tipo 2, se obtuvo solo la banda esperada de 120 pb (Figura 3).

Por otro lado, la restricción enzimática con *Hinc II* del producto de 120 pb generó dos fragmentos menores de 85 y 35 pb, respectivamente (datos no presentados).

La sensibilidad y especificidad obtenida con esta metodología permite genotipificar al VD tipo 2 inequívocamente, diferenciándolo de los otros miembros de la familia que suelen dar reacción cruzada cuando se emplean métodos estándares de diagnóstico [12].

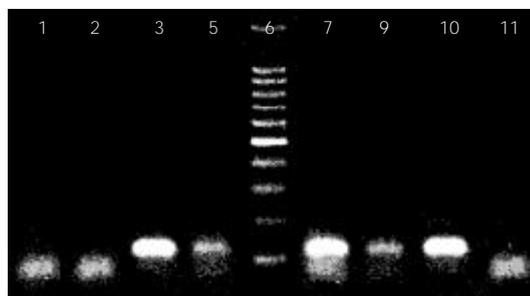


FIGURA 3: especificidad de reacción. PCR tipos específicas. Calles 1 y 2, PCR con cebador TS1 solo, diluciones 1/10 y 1/50; Calles 3 y 4, PCR con cebador TS2 solo, diluciones 1/10 y 1/50; Calles 6 y 7, PCR multiplex con cebadores TS1 y TS2, diluciones 1/10 y 1/50; Calles 8 y 9, controles (+) y (-) de reacción; Calle 5, escalera de 100 pb.

Además, el diseño de estudios prospectivos a campo con estaciones de monitoreo permanente, en los que deben considerarse diversas variables como densidad poblacional humana y de vector, requiere el análisis de un número de lotes de mosquitos considerablemente grande. Por ello, es necesario disponer de una metodología rápida y sensible.

Si el aumento de la densidad poblacional del vector, expresada mediante el índice de casa (HI), precede a la aparición de casos humanos de Dengue en zonas endémicas, es de esperarse un concomitante aumento de mosquitos infectados dentro de la población del vector. Chow *et al.* (1998) observaron dicho incremento con seis semanas de anticipación al brote epidémico, aun cuando los niveles de infestación registrados (HI) durante el período pre-epidémico eran inferiores a los considerados como críticos por la O.P.S. [14]. La extrapolación de estos resultados debe realizarse con reservas para zonas subtropicales no endémicas con riesgo de epidemia, debido a que la dinámica de la mantención del virus en los reservorios es distinta para ambas.

CONCLUSIONES

Durante la realización de este trabajo se ha confirmado la presencia del mosquito vector *Aedes aegypti* en la ciudad de Posadas, provincia de Misiones, cuya existencia es un factor necesario para la transmisión del VD.

La extracción y purificación del genoma viral de lotes de mosquitos es factible en este modelo experimental mediante el empleo de agentes caotrópicos y solventes orgánicos que inhiben el efecto de las ARNasas y detritos celulares; además, el uso de partículas de sílica disminuye considerablemente el tiempo requerido por el proceso extractivo en comparación con otros métodos propuestos.

La detección molecular del VD serotipo 2 lograda mediante RT-PCR genérica emplea una sola enzima (*rTth pol*) con una posterior PCR *seminested* tipos específica, poseyendo una sensibilidad que asegura la detección viral en trabajos que contemplen la captura del vector a campo.

AGRADECIMIENTOS

A la Licenciada Aída Tricio y a su grupo, Cátedra de Ecología I, U.Na.M., por la taxonomía de

mosquitos y su experiencia transmitida en técnicas de muestreo.

Al Dr. Schatzmayr y a su grupo del Laboratorio de Flavivirus del Instituto Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, Brasil, por la cepa viral y asesoramiento en las metodologías clásicas y moleculares de detección del VD.

BIBLIOGRAFIA

1. Bancroft, W. H.; Mc Cown, J. M.; Lago, P. M.; Brandt, W. E.; Russell, P. K. *Identification of Dengue viruses from the Caribbean by plaque-reduction neutralization test*. Pan. Am. Health Org. Sci. Publ. 375: 175-178. 1979.
2. Boom, R.; Sol, C. J.; Salimans, M. M.; Jansen, C. L.; Wertheim-van Dillen, P. M.; van der Noorda, J. *Rapid and simple method for purification of nucleic acids*. J. Clin. Microb. 28: 495-503. 1990.
3. Chow, V.; Chan, Y.; Yong, R.; Lee, M.; Lim, L.; Chung, Y.; Lam-Phua, S.; Tan, B. *Monitoring of dengue viruses in field-caught Aedes aegypti and Aedes albopictus mosquitoes by a type-specific polymerase chain reaction and cycle sequencing*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 58(5): 578-586. 1998.
4. Chungue, E.; Roche, M.; Lefevre, M.; Barbazan, P.; Chanteau, S. *Ultra-rapid, simple, sensitive, and economical silica method for extraction of dengue viral RNA from clinical specimens and mosquitoes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction*. J. Med. Virol. 40: 142-145. 1993.
5. Gubler, D. J.; Kuno, G.; Sather, G.; Valez, M.; Oliver, A. *Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 33 (4): 158-165. 1984.
6. Gubler, D.; Trent, D. *Emergence of epidemic dengue/dengue haemorrhagic fever as a public health problem in the Americas*. Infect. Agent. Dis. 1994.
7. Gubler, D.; Clarke, G. *Dengue/dengue haemorrhagic fever: the emergence of a global health problem*. Emerg. Infect. Dis. 1: 55-57. 1995.
8. Harris, E. *Developing essential scientific capability in countries with limited resources*. Nat. Med. 2: 737-739. 1996.
9. Harris, E.; Roberts, G.; Smith, L.; Selle, J.; Kramer, L.; Valle, S.; Sandoval, E.; Balmaseda, A. *Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR*. J. Clin. Microb. 36 (9): 2634-2639. 1998.
10. Lanciotti, R.; Calisher, C.; Gubler, D.; Chang, G.; Vorndam, V. *Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction*. J. Clin. Virol. 30: 545-551. 1992.
11. Miagostovich, M. P.; Nogueira, R. M.; Schatzmayr, H.; Lanciotti, R. *Molecular epidemiology of den-2 virus in Brazil*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 93 (5): 625-626. 1998.
12. Monath, T. P.; Heinz, F. X. *Flaviviruses*. En Fields Virology, B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley (Ed). Lippincott-Raven Pub., Philadelphia, Pa. 961-1034. 1996.
13. Nogueira, R. M.; Miagostovich, M. P.; Lampe, E.; Souza, R. W.; Zagne, S. M.; Schatzmayr, H. *Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil, 1990-1: cocirculation of dengue 1 and dengue 2 serotypes*. Epidemiol. Infect. 111: 163-170. 1993.
14. O.P.S. Publicación N° 548. *Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control*. 1994.
15. Peters, C. J. *Viral hemorrhagic fevers*. En Viral Pathogenesis, Nathanson, N. (Ed.), Lippincott-Raven Pub., Philadelphia, Pa. 779-799p. 1997.
16. Rosen, L.; Shroyer, D. A.; Tesh, R.; Freier, J.; Lien, J. C. *Transovarial transmission of dengue viruses by mosquitoes Aedes albopictus and Aedes aegypti*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 32 (5): 1108-1119. 1983.
17. Rosen, L.; Gubler, D. *The use of mosquitoes to detect and propagate dengue viruses*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 23: 1153-1160. 1974.
18. Tesh, R. *A method for the isolation and identification of dengue viruses, using mosquito cell cultures*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 28 (6): 1053-1059. 1979.
19. Thayran, R. *Optimized Dengue RT-PCR*. Bionews 11: 12-13. 1999.
20. Thu, H. M.; Aye, K. M.; Thein, S. *The effect of temperature and humidity on dengue virus propagation in Aedes aegypti mosquitoes*. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 29 (2): 280-284. 1998.