



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DEL VIRUS DEL DENGUE MEDIANTE ENSAYOS DE MOVILIDAD DE HETERODUPLEX (HMA) EN EL ESTADO DE QUERÉTARO.

Valeria Martín del Campo Pérez^(1,2), José Carmen Gudiño Rosales^(1,2). (1) Laboratorio de Diagnóstico Molecular, Laboratorio Estatal de Salud Pública de Querétaro. (2) Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, Qro. C.P. 76010. [Valeria Martín del Campo Pérez: valmcp@gmail.com](mailto:valmcp@gmail.com).

Palabras clave: Heteroduplex, Dengue-virus, Genotipificación.

Introducción. Las infecciones por el virus del dengue, un problema de salud pública nivel mundial, se han extendido a nuevas zonas geográficas. Querétaro, antes considerado un estado libre de dengue, ha reportado casos desde el 2005 en la sierra (3). La enfermedad es provocada por cualquiera de los cuatro serotipos virales (DENV1-4) (2). La tipificación viral es parte importante de la vigilancia epidemiológica para implementar acciones encaminadas a prevenir la aparición de casos de dengue, y sus manifestaciones graves (dengue hemorrágico y síndrome de choque por dengue). La tipificación por Ensayo de Movilidad de Heteroduplex (HMA) con productos de PCR puede ser una alternativa económica, rápida y sensible, en comparación con otros métodos (4). El objetivo es determinar mediante HMA, el serotipo viral en muestras clínicas de casos confirmados de dengue en el estado y comparar los resultados contra la tipificación por RT-PCR en tiempo real.

Metodología. Se realizó extracción de ácidos nucleicos totales del sobrenadante de cultivos de virus de los cuatro serotipos y de muestras clínicas de pacientes con infección confirmada por dengue en Querétaro en 2009. Mediante RT-PCR se amplificó un fragmento de 163 pb con oligonucleótidos comunes para los 4 serotipos. La formación de heteroduplex se realizó mezclando una alícuota del producto amplificado de los virus de referencia con el de cada muestra clínica, calentando a 95°C y enfriando a 4°C. El análisis se realizó en geles de poliacrilamida al 7.5% teñidos con bromuro de etidio.

Resultados. Para estandarizar la técnica se realizó HMA con los amplicones de los 4 serotipos de referencia entre sí. En la figura 1 se muestra el patrón de migración de homoduplex (Ho) y heteroduplex (He) entre los virus de referencia. Cada serotipo por sí solo no muestra formación de heteroduplex (Carriles 1, 5, 8 y 10), a diferencia de las combinaciones (carriles 2, 3, 4, 6, 7 y 9).

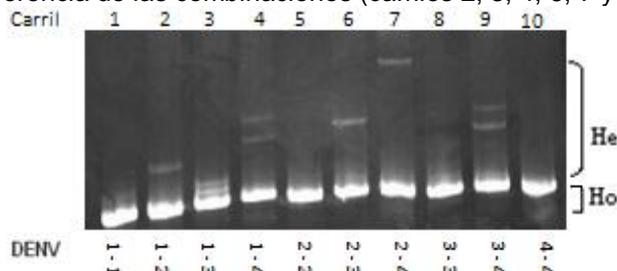


Fig. 1. El HMA, se realizó con 3.5 µl del producto de PCR de cada virus de referencia (DENV 1-4), según las combinaciones señaladas en la parte inferior de la figura.

Los productos de PCR de las muestras clínicas se analizaron por HMA con los amplicones de cada virus de referencia. En la figura 2 se presentan ejemplos de los patrones de migración de heteroduplex observados. En cada panel se presenta la combinación de una muestra clínica (a, b, c, d) con los amplicones de los serotipos: Carril 1 (DENV1); 2 (DENV2); 3 (DENV3) y 4 (DENV4). Se observa solo formación del homoduplex en el carril 1 de cada panel, por lo cual se determinó que el virus circulante en Querétaro es el DENV-1. Así mismo, se observan diferencias en los patrones de heteroduplex lo cual sugieren que existe variabilidad genética al interior del serotipo.

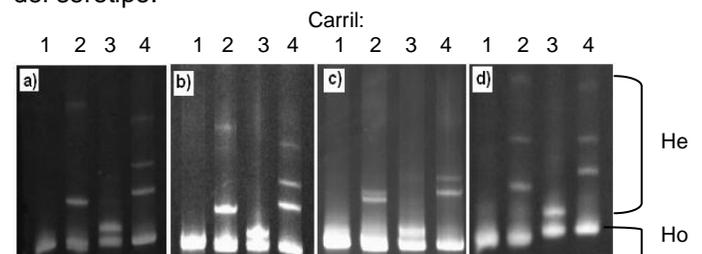


Fig. 2. Patrones de HMA observados para 4 muestras clínicas de pacientes con infección confirmada por dengue.

Conclusiones. Se han tipificado 21 muestras clínicas como infecciones por virus del dengue del serotipo 1 mediante HMA. Las diferencias en los patrones de bandas observados sugieren la existencia de variabilidad genética intra-serotípica. La caracterización del serotipo por HMA fue confirmada mediante RT-PCR en tiempo real, realizada utilizando primers específicos de cada serotipo (5). El HMA es una alternativa sensible y económica para la tipificación del virus del dengue.

Agradecimiento. Al Laboratorio de Arbovirus del Departamento de Virología del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, de la Secretaría de Salud por la donación de los cultivos de virus del dengue.

Bibliografía

1. Organización Mundial de la Salud (*OMS en línea*). 25/10/10.
2. Guha-Sapir, D., Schimmer, B. (2005). *ETE*. Vol.(2): 1-10.
3. Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (*CENAVECE en línea*). Octubre 19 de 2010.
4. Margraf, R. L., Erali, M., Liew, M., Wittwer, C. T. (2004). *JCM*. Vol. 42: 4545-4551.
5. Pei-Yun S., Shu-Fen C., Yu-Chung K., Yi-Yun Y., Li-Jung C., Chien-Lin S., Ting-Hsiang L., and Jyh-Hsiung H. (2003). *JCM*. Vol 41: 2408-2416.