

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD MEDICINA
ESCUELA DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO



**DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DEL DENGUE, ZIKA Y CHIKUNGUNYA
MEDIANTE LA DETECCIÓN DE ÁCIDO RIBONUCLEICO POR EL MÉTODO DE
BIOLOGÍA MOLECULAR, SAN SALVADOR EN EL MES DE JULIO 2023.**

Presentado por:

LEONARDO ENRIQUE MAGAÑA CASTRO.

Para optar por el grado de:

LICENCIADO EN LABORATORIO CLÍNICO.

Asesor:

DRA. BEATRIZ ELENA ARCHILA DE FLORES.

Ciudad universitaria “Dr. Fabio Castillo Figueroa” San Salvador agosto 2023

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

Rector

Msc, Roger Armando Arias

Vicerrector Académico

PhD. Raúl Ernesto Azcúnaga López

Vicerrector administrativo

Ing. Juan Rosa Quintanilla

Secretario General

Ing. Francisco Antonio Alarcón

AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE MEDICINA

Decana

Msc. Josefina Sibrían de Rodríguez

Vicedecano

Dr. Saul Diaz Peña

Secretaria

Msc. Aura Marina de Arce

Director de Escuela

Msc. José Eduardo Zepeda

Directora de Carrera

MsP. Miriam Cecilia de Barrera

CONTENIDO

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR.....	ii
AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE MEDICINA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	v
RESUMEN.....	vi
I. INTRODUCCIÓN.....	x
II. DESARROLLO.....	12
III. CONCLUSIONES.....	16
IV. FUENTES DE INFORMACIÓN.....	17

AGRADECIMIENTOS

A Dios,

Por bendecirme con este logro tan grande en mi vida, sin su ayuda esto no hubiese sido posible.

A mis padres,

Por enseñarme que con esfuerzo y perseverancia las metas se pueden alcanzar, siempre han sido mis mejores guías de vida, Aunque mi padre ya no se encuentra en vida estoy seguro que se alegrara muchísimo cuando culmine mi carrera que con cuanto sacrificio permitió que siguiera adelante.

A mis hermanos,

Por ser parte fundamental en mi vida y por creer en mí, por estar siempre presentes, acompañándome y por el apoyo moral que me brindaron a lo largo de esta etapa de mi vida.

A mis docentes,

Gracias por impulsarme a ser cada día mejor.

Gracias por esa sonrisa, gracias por tus enseñanzas, gracias por la paciencia y por todas las lecciones que nos transmitían. Agradezco su esfuerzo y dedicación durante todo este tiempo, ya que con su sabiduría, me enseñaron también a ser mejor persona.

Leonardo Enrique Magaña Castro

RESUMEN

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) está al alcance económico de la mayoría de los laboratorios y se ha convertido en una técnica indispensable para el diagnóstico médico. Es posible amplificar fragmentos que contienen mutaciones conocidas (diagnósticas) o mutaciones desconocidas, que serán secuenciadas y confirmadas tras la PCR. Esto es de gran ayuda en el diagnóstico y asociación de variantes genéticas y enfermedades.

Para las enfermedades adquiridas, la detección del genoma del patógeno es la aplicación diagnóstica de la PCR más utilizada. Debido a su alta sensibilidad, puede detectar incluso muy pocas copias del genoma, lo que suele ocurrir en las primeras etapas de la infección; por lo tanto, la PCR permite un diagnóstico temprano.

A diferencia de muchas otras pruebas, las pruebas de PCR pueden detectar enfermedad en las primeras etapas de infección. Es posible que otras pruebas no detecten signos tempranos de enfermedad porque no hay suficiente virus en la muestra o porque su cuerpo no ha tenido tiempo suficiente para desarrollar respuesta de anticuerpos.

Durante una prueba de PCR, una pequeña cantidad de material genético de una muestra se copia muchas veces. El proceso de copia se llama amplificación.

La reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) está diseñado para detectar el Ácido ribonucleico (ARN) del virus en plasma, suero u orina de pacientes que presentan signos y síntomas de infección, Ya que su constitución genética es ARN con este método de biología molecular se puede realizar el diagnostico aunque la persona posea las mismas manifestaciones clínicas ya que cada una posee diferencias entre en su constitución genética.

Ya que el dengue, zika y chikungunya están formados por ARN en lugar de ADN. En estos virus, el ARN se debe transformar en ADN antes de copiarse. Este proceso se conoce como PCR de transcripción inversa (rtPCR).

Las pruebas de PCR y de rtPCR detectan la presencia de un patógeno. Otro tipo de prueba de PCR conocida como PCR cuantitativa (qPCR) mide la cantidad de patógenos en la muestra. La qPCR se puede hacer al mismo tiempo que la PCR o la rtPCR.

palabras clave: Dengue, Zika, Chikungunya, Reacción en cadena de la polimerasa, Transcriptasa inversa, Biología molecular.

ABSTRACT

Polymerase chain reaction (PCR) is within the affordable reach of most laboratories and has become an indispensable technique for medical diagnosis. It is possible to amplify fragments containing known (diagnostic) mutations or unknown mutations, which will be sequenced and confirmed after PCR. This is of great help in the diagnosis and association of genetic variants and diseases.

For acquired diseases, detection of the pathogen genome is the most widely used diagnostic application of PCR. Due to its high sensitivity, it can detect even very few copies of the genome, which usually occurs in the early stages of infection; therefore, PCR allows for early diagnosis.

Unlike many other tests, PCR tests can detect disease in the early stages of infection. Other tests may not detect early signs of disease because there is not enough virus in the sample or because your body has not had enough time to develop an antibody response.

During a PCR test, a small amount of genetic material from a sample is copied many times. The copying process is called amplification.

The reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) is designed to detect the ribonucleic acid (RNA) of the virus in plasma, serum or urine of patients who present signs and symptoms of infection, since their genetic makeup is RNA. With this method of molecular biology, the diagnosis can be made even if the person has the same clinical manifestations since each one has differences between their genetic constitution.

Since dengue, zika and chikungunya are made up of RNA instead of DNA. In these viruses, the RNA must be transformed into DNA before it can be copied. This process is known as reverse transcription PCR (rtPCR).

PCR and rtPCR tests detect the presence of a pathogen. Another type of PCR test known as quantitative PCR (qPCR) measures the amount of pathogens in the sample. qPCR can be done at the same time as PCR or rtPCR.

Keywords: Dengue, Zika, Chikungunya, Polymerase chain reaction, Reverse transcriptase, Molecular biology.

I. INTRODUCCIÓN

Los virus transmitidos por artrópodos (arbovirus) infectan a los humanos principalmente a través de la picadura de artrópodos chupadores de sangre, como mosquitos, garrapatas y jejenes.

El dengue es la enfermedad viral transmitida por mosquitos más prevalente en las Américas y es más sospechosa en pacientes febriles. Sin embargo, la reciente introducción de dos nuevos arbovirus (el virus Chikungunya a finales de 2013 y el virus Zika en 2014) ha traído nuevos desafíos de salud pública a las Américas. Tres arbovirus (dengue, chikungunya y Zika) pueden producir manifestaciones clínicas muy similares, principalmente en la fase aguda (primeros días de la enfermedad), dificultando el diagnóstico clínico al personal de salud, lo que genera problemas para su adecuado manejo y en ocasiones eventos fatales.

Hay más de 100 arbovirus que pueden causar infecciones y enfermedades en humanos. Estas infecciones varían desde asintomáticas hasta potencialmente mortales.

Los arbovirus son virus polifiléticos de varias familias y géneros, incluidos flavivirus (Flaviviridae), alfavirus (Togaviridae), tienen genomas de ARN monocatenario (genomas de sentido positivo en las familias Flaviviridae y Togaviridae, y genomas de sentido negativo en las familias Peribunyaviridae y Phenuiviridae), mientras que los de la familia Reoviridae tienen ácido ribonucleico (ARN) bicatenario.

Los arbovirus más importantes en las Américas son los flavivirus, incluidos el virus del dengue (DENV), el virus del Zika (ZIKV).

Los alfavirus también son comunes, incluido el virus chikungunya (CHIKV).

El virus Zika (ZIKV), el virus del dengue (DENV) y el virus chikungunya (CHIKV) son virus transmitidos por artrópodos (arbovirus) cuyo vector común son los mosquitos pertenecientes al género Aedes, específicamente el mosquito Aedes aegypti.

El cambio climático, la urbanización y la globalización favorecen la propagación de estos virus, lo que resulta en epidemias, cocirculación en la misma área geográfica y potencial de coinfección de virus dentro del mismo huésped. En la actualidad, las principales zonas endémicas son África, el Sudeste Asiático, las Islas del Pacífico y América Central y del Sur.

Además, estos arbovirus provocan manifestaciones clínicas similares, especialmente en las primeras etapas de la infección (fiebre, dolor de cabeza, erupción cutánea, dolores musculares y articulares y síntomas gastrointestinales). El diagnóstico temprano y preciso es crucial porque comparten la misma presentación clínica y la infección se maneja de manera diferente en cada individuo.

Por tanto, el diagnóstico diferencial de ZIKV, DENV y CHIKV es muy importante en pacientes con síntomas clínicos sospechosos que viven o han visitado zonas endémicas.

Las pruebas de diagnóstico se basan en la detección del virus, de sus componentes (antígenos o ácidos nucleicos) o en la detección de la respuesta inmune del huésped al virus. Sin embargo, la serología tiene una utilidad limitada debido a la reactividad cruzada de los anticuerpos contra estos arbovirus. Por otro lado, la RT-PCR en tiempo real es un método útil de detección en la fase aguda de la infección.

II. DESARROLLO

Zika (ZIKV), Dengue (DENV) y Chikungunya (CHIKV) son virus transmitidos por artrópodos (arbovirus) que tienen como vector común los mosquitos pertenecientes al género *Aedes*, específicamente *Ae. aegypti* y *Ae. Albopictus*. La diseminación de estos virus se ve favorecida por el cambio climático, la urbanización y la globalización, provocando epidemias, cocirculación en las mismas áreas geográficas, así como la posibilidad de co-infección viral dentro de un único huésped. Actualmente las principales regiones endémicas son África, el sudeste de Asia, las islas del Pacífico y Centro-Sur América.

Además, estos arbovirus causan cuadros clínicos similares, especialmente en las etapas iniciales de la infección (fiebre, dolor de cabeza, erupciones en la piel, dolor muscular y articular y síntomas gastrointestinales). Un diagnóstico precoz y preciso es imprescindible debido a que comparten el mismo cuadro clínico y el manejo de la infección es diferente para cada uno de ellos. (VIASURE, s.f, p.14)¹

De esta manera se evita dar un tratamiento erróneo al paciente. Ya que una persona que este infectada con Dengue hemorrágico por ejemplo esta estrictamente prohibido indicarle aspirina ya que puede ocasionarle la muerte.

El diagnostico se lleva a cabo mediante la detección de material genético específico de cada arbovirus.

Para el dengue se detecta la proteína no estructural NS1 del virus. Esta proteína se secreta a la sangre durante la infección por dengue. La prueba de NS1 ha sido elaborada para ser usada en suero. En la mayoría de estas pruebas se usan anticuerpos sintéticos para detectar la proteína NS1 del dengue. (Centro de Enfermedades Contagiosas [CDC], s.f.)²

El diagnóstico de zika se realiza a través de la proteasa NS2B/NS3. (National Library of Medicine, [NIH], s.f.)³

La nsP1 (proteína no estructural uno) del virus chikungunya es la responsable de la invasión de estas membranas, así como del camuflaje de los genomas virales, que son confundidos con la información genética de la célula. (Consejo Superior de Investigaciones Científicas [NSIC], 2020)⁴

Las técnicas de Biología Molecular (BM) permiten la detección de material genético (Ácidos Nucleicos), tanto DNA como RNA, que constituyen la característica inequívoca de especie y sus modificaciones como mutaciones, deleciones y translocaciones, las cuales tienen diferentes implicancias según la situación estudiada. En microbiología permiten la detección de porciones de ácidos nucleicos (AN) (DNA o RNA) que son específicos de cada microorganismo, en diferentes materiales clínicos. Su aplicación, surge como una necesidad para poder detectar microorganismos de difícil crecimiento en cultivos o desarrollos tardíos y donde las técnicas serológicas de detección de antígenos (Ag) y anticuerpos (Ac) carecen de suficiente sensibilidad y especificidad diagnóstica. Esta circunstancia se ajusta principalmente a la detección de virus, es por ello, que el desarrollo de técnicas moleculares comenzó en esta área. (Técnicas moleculares de Microbiología en la práctica diaria, s.f. p.1)⁵

Debido a la deficiente detección de los antígenos y anticuerpos surgen las pruebas de biología molecular para suplantar estas técnicas que requieren de demasiado tiempo y así beneficiar al sistema de salud, en donde ya no se espera a que el paciente pase más de una semana con fuertes episodios de fiebre tan solo para saber la causa.

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tiene como finalidad la amplificación en masa de determinado fragmento de DNA por medio de un termociclador. Consiste en manera

global en una serie repetitiva de ciclos, cada uno de los cuales consta de un patrón de desnaturalización (temperatura 94°C), un tiempo de alineamiento del primer (temperatura de 45-55°C) y un periodo de extensión (temperatura de 72° C), que se logra mediante una enzima DNA polimerasa termoestable, para crear una acumulación de fragmentos específicos. El producto sintetizado en cada ciclo puede servir como patrón en el próximo número de copias de DNA, creándose una reacción en cadena que permite amplificar un fragmento específico de DNA. Esta técnica ofrece sensibilidad debido a que a partir de cantidades muy pequeñas de material genético se detecta la presencia del microorganismo en una muestra; ofrece especificidad ya que a través de condiciones estrictas se logra amplificar únicamente el microorganismo que se busca detectar; y ofrece oportunidad ya que permite un procesamiento rápido si se compara con otras técnicas como cultivos celulares para aislamiento de virus. (Pereira, Gaviria, Zea, Jaramillo, Bedoya, 2018.)⁶

Dado que los virus analizados en este documento tienen un genoma ARN, es necesario sintetizar un ADN complementario (ADNc) a partir del ARN viral antes de la amplificación por PCR. Esto se logra por transcripción inversa. La combinación de ambas técnicas se denomina reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa. (Organización Panamericana de la Salud [OPS])⁷

La retrotranscripción es una reacción para la conversión del ARN en ADNc y en general se lleva a cabo antes de una PCR, cuando se pretende analizar secuencias de ARN. La realización consecutiva de una retrotranscripción y una PCR se conoce como RT-PCR. Esta técnica es una variante de la técnica convencional de PCR, con el objetivo de amplificar un ARN específico para evaluar su expresión o presencia.

Los pasos de que consta esta reacción son desnaturalización del ARN a 70°C por 10 minutos para eliminar estructuras secundarias, alineación de los hexámeros por 10 min a 25°C y polimerización por la retrotranscriptasa a 37°C por una hora. Una vez obtenida la cadena de ADNc, ésta se emplea como molde para la técnica de PCR. (Salazar, Sandoval, Armendáriz, 2013, P. 156)⁸

La PCR con el tiempo ha ido mejorando aun mas en donde ya no es necesario el uso de un gel de agarosa en donde se tenía que preparar para luego sumergirlo en un aparato eléctrico que proporciona carga eléctricas positivas y negativas en donde dependiendo a su peso y carga eléctrica migrarían a través de los poros del gel para luego teñirlas con un colorante y compararlas con controles conocidos, esta técnica se conoce como electroforesis.

Debido a la necesidad de hacer mas practico y menos laborioso el diagnostico de PCR surge la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, esta es una variante de PCR que añade marcadores fluorescentes con el objetivo de saber la cantidad de ADN inicial en todo momento y detectar la presencia de variaciones genéticas. La emisión de fluorescencia será proporcional al número de moléculas producidas haciendo que la técnica sea cuantitativa, estos datos se ven reflejados mediante graficas que están siendo monitoreadas, analizadas y almacenando datos para su lectura de manera autónoma y en tiempo real, de ahí el nombre de la técnica.

Una PCR múltiple refiere al uso de reacción de cadena de la polimerasa para amplificar varias secuencias de ADN diferentes simultáneamente (como si se realizaran muchas reacciones de PCR separadas todas juntas en una sola reacción). (Universidad de Girona, 2022.)⁹

III. CONCLUSIONES

La PCR tiene grandes ventajas sobre otros métodos tradicionales. Su especificidad y alta sensibilidad son sus mayores puntos fuertes. Ya que puede detectar la mayoría de los agentes infecciosos en muchos tipos diferentes de muestras.

La RT-PCR en tiempo real facilita el diagnóstico entre Dengue Zika y Chikungunya, ya que puede diferenciarlas desde el primer día de la aparición de los síntomas. Realizando la amplificación específica de nucleótidos de cada arbovirus dentro de las muestras, como se menciona anteriormente; en el caso del dengue la proteína no estructural NS1, para el Zika la proteasa NS2B/NS3 y para el Chikungunya mediante la detección de la proteína no estructural nsP1.

La implementación de este método a mejorado y agilizado la oportunidad de diagnóstico y la epidemiología ya que en una sola reacción podemos identificar cualquiera de los 3 arbovirus mencionados, y con ello obtener un resultado más oportuno y exacto.

Esta técnica permite identificar co-infecciones en los pacientes, lo que nos pone en alerta por la facilidad con lo que la población se está infectando hasta por dos arbovirus al mismo tiempo.

La vigilancia genómica mediante secuenciación nucleotídica permite identificar los tipos, genotipos y linajes de los virus que circulan en una zona determinada. Los análisis filogenéticos y de la evolución de las secuencias de nucleótidos virales brindan conocimientos importantes sobre el origen, la evolución, la emergencia, la epidemiología, la transmisión y la patogenia de los arbovirus, y ayudan a entender estos procesos. Tal información también contribuye al establecimiento de métodos diagnósticos y medidas de prevención y control. La genotipificación viral es especialmente importante en situaciones de brotes, en que los virus emergen o reemergen en una zona dada, así como cuando se notifican resultados clínicos atípicos.

IV. FUENTES DE INFORMACIÓN

1. VIASURE. (s.f.). Zika, Dengue & Chikungunya Real Time PCR Detection Kit. P. 14
<https://drive.google.com/file/d/0B9W3ymvaZnt6c054WmZSRk1ZdHc/view?resourcekey=0-FZf3UjMxeEca5j2MgPotwA>
2. Detección de antígenos del virus del dengue. (s.f.). Centro de Enfermedades Contagiosas CDC.
<https://www.cdc.gov/dengue/es/healthcare-providers/testing/antigen-detection.html>
3. La estructura de la proteasa del virus Zika, NS2B/NS3. (s.f.). National Library of Medicine NIH.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29845530/>
4. Revelada la estructura atómica de una proteína del virus chikungunya clave para su replicación en las células Consejo Superior de Investigaciones Científicas [NSIC], 2020
https://www.csic.es/sites/www.csic.es/files/16diciembre2020_chikungunya_.pdf
5. Técnicas moleculares de Microbiología en la práctica diaria. P.1
<http://revistabioanálisis.com/images/flippingbook/Rev8%20n/nota2.pdf>
6. Juan C. Pereira-Palacio, Lady J. Gaviria-Mejía, Sebastián Zea-Castrillón, Patricia E Jaramillo Arbelaez2, Astrid Bedoya. (2018). Descripción de pruebas moleculares en el diagnóstico del virus Zika en el periodo 2008-Febrero 2018 Revisión sistemática.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702018000200081

7. Recomendaciones para la detección y el diagnóstico por laboratorio de infecciones por arbovirus en la Región de las Américas. (2022). Organización Panamericana de la Salud OPS/ Organización Mundial de la Salud OMS.

https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/56321/9789275325872_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y

8. Adriana María Salazar Montes, Ana Soledad Sandoval Rodríguez, Juan Socorro Armendáriz Borunda. 2013. *Biología molecular Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. EE. UU. p156.

9. Pcr múltiple. 2022. Universidad de Girona.

<https://www.studocu.com/ca-es/document/universitat-de-girona/genetica/pcr-multiple/37020677>