



CURSO DE PCR DENGUE. EL SALVADOR 2011

PROTOCOLO: Genotipificación por RT-PCR/RSS-PCR del virus del dengue en huevos, larvas y hembras adultas como diagnóstico preliminar versus Correlación serotipo circulante en la zona metropolitana de San Salvador. 2011

Presentado por: Master Dr. Antonio Vásquez Hidalgo
 Microbiólogo Medico Salubrista
 Docente de la Facultad de Medicina
 Universidad de El Salvador.

Introducción.

A nivel mundial el Paludismo y el Dengue se consideran como una de las Enfermedades que ha ocupado algún lugar en las diez primeras causas de morbilidad y mortalidad, de los reportes epidemiológicos del Ministerio de Salud.. Localizado en muchos países como áreas endémicas y epidémicas con un alto riesgo. De igual forma se ha reportado en todas las regiones del planeta.¹

Para septiembre 2011 se tiene sospecha por dengue mas de 8000 casos, reportándose San Salvador y San Miguel con el mayor número de casos. A nivel mundial se estima 1 380 millones en riesgo de transmisión por *Malaria y Dengue*.^{*1}

Se hacen esfuerzos mundiales auspiciados o dirigidos por la **OMS, OPS** y otros, para controlar y erradicar el vector, pero que hasta el momento ha sido imposible de lograr resultados prometedores. Se han utilizado diversos métodos de control, en las que se destaca el uso de químicos en las plantaciones y áreas domiciliarias, con el consiguiente riesgo de causar intoxicaciones en el ser humano.²

Al momento el Dengue es un problema de Salud Pública y de gobiernos, debido a que se invierten millones de dólares en erradicar el vector y tratar la enfermedad, derivados del presupuesto nacional asignado a salud.

^{*1} Hay; Simón. y otros. Un mapa mundial de malaria: Endemicidad de *Plasmodium falciparum* en el 2007.



El Salvador no es la excepción, debido a que por su climatología y densidad poblacional, hace favorable la transmisión palúdica, con predominio en la estación seca y lluviosa con temperaturas entre 22⁰C a 30⁰C en zonas costeras o sabanas tropicales y desplazamiento en alturas menores de 300 mts hacen propicio condiciones ideales para su estancia y propagación.

JUSTIFICACION.

Al utilizar el PCR como método de diagnóstico de examen de laboratorio en los casos de Dengue en la tipificación de huevos, larvas y hembras adultas, puede contribuir a la comunidad a prevenir el riesgo de cual serotipo está circulando en la zona y tomar las medidas correspondientes en el plan de vigilancia y control epidemiológico.

OBJETIVOS

GENERAL:

Identificar por medio de RT-PCR y RSS-PCR la genotipificación de huevos, larvas y zancudos del serotipo circulante en el país.

ESPECIFICOS:

1. Utilizar el RT-PCR en la genotipificación de grupos de huevos, larvas y hembras adultas hematófagas.
2. Identificar las zonas potenciales de riesgo en la zona metropolitana de San Salvador
3. Correlacionar el tipo de serotipo en relación al ciclo de vida del zancudo del dengue.

HIPOTESIS

H1: La correlación diagnóstica entre genotipificación de grupos de huevos, larvas y hembras hematófagas por medio de RT-PCR a dengue indica el serotipo del virus del dengue

H0: No existe correlación diagnóstica entre genotipificación de grupos de huevos, larvas y hembras hematófagas por medio de RT-PCR a dengue indica el serotipo del virus del dengue



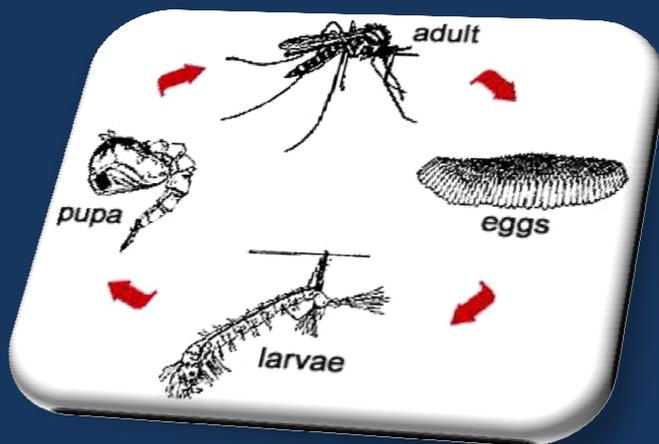
MARCO TEORICO

ANTECEDENTES

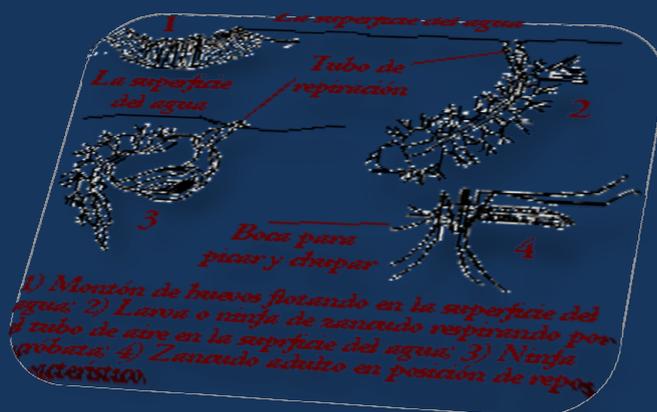
En El Salvador desde hace varias décadas, se han realizado métodos de vigilancia, control y erradicación entomológica de los vectores en zonas endémicos ya identificados en las comunidades urbano marginales y rurales de nuestro país por el MSPAS.

En 1993 la OMS tomó el liderazgo en la “Declaración Mundial en la lucha Antipalúdica” en coordinación con los estados miembros para crear sistemas eficaces de Vigilancia y control epidemiológico local.

El ciclo de vida:



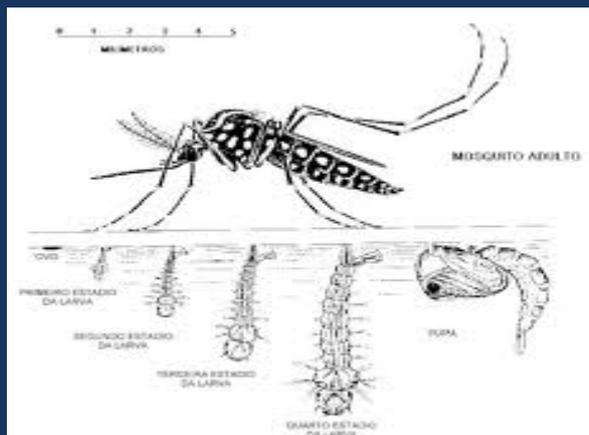
Huevo: la hembra deposita los huevos en partes húmedas o en agua. Cada hembra puede depositar entre 100 a 500 huevecillos, eclosionando estos entre 24 a 72 hrs a una temperatura de 21 C. los huevos pueden resistir hasta por 450 días.



Larvas: viven debajo de la superficie del agua tomando su alimento. Generalmente nadan hacia el fondo haciendo un ocho y luego regresan a la superficie para obtener oxígeno. Las larvas por lo general tienen 4 fases o estadios larvales: L1 es la que eclosiona del huevo, a los dos días pierde el exoesqueleto y pasa al segundo estadio L2; el tercer y cuarto estadio L3, L4 se desarrolla entre uno a dos días. La L4 se desarrolla en pupa, la larva cuando posa en agua lo hace formando un ángulo de 45 grados.



Adultos: es el zancudo que vive en casa o proximal a ella, es de color azul negro, manchas plateadas a los lados del cuerpo, tiene anillos blancos en las patas, se posa en forma horizontal.



La hembra es hematófaga o antropofílica, pica de día o durante la noche, puede picar hasta 8 veces al día, reposa en la vivienda. Algunas hembras pueden volar hasta 3 km para poner los huevos otras viven a menos de 50 metros de las casas donde nacieron.

Principales Métodos de Control.

Entre los principales métodos de control utilizados a nivel mundial,¹¹⁻²¹ están: 1. Método químico. Se han descrito dos: insecticida y herbicida, derivados de organofosforados y organoclorados, peritroides y otros. Son considerados como métodos temporales. En la última década se han reportado casos de resistencia especialmente a los organofosforados, organoclorados y peritroides.²²⁻²⁵ También se ha encontrado transmisión hereditaria por genes a nuevas generaciones²⁶, 2. Control físico, 3. Control Patógeno, 4. Control Personal, 5. Control Cultural, 6. Control Biológico, 7. Control Natural y 8. Control legal.

Técnica de RT- PCR y RSS-PCR

Es una Variante de la PCR donde inicialmente se realiza una Transcripción reversa a partir de ARN para sintetizar el ADN complementario que luego es amplificado mediante una PCR.

MATERIAL Y METODOS.

METODOLOGIA.

- A. **En cada bloque** se agregan 6 vasijas de 250 ml conteniendo: 100 huevos, 100 larvas, 100 hembras adultas se tapan los recipientes colocando una gasa.
- B. **Muestras de suero** en ratones lactantes alimentados con hembras adultas con sospecha de dengue.
- C. **Muestras de huevos y larvas** por medio de identificación PCR



- D. **Extracción ARN Viral.** El ARN viral se extrae utilizando el QIAamp viral RNA Mini Kit según protocolo establecido por el fabricante.
- E. **Utilizar RSS-PCR** para identificación de genotipo, el análisis se hace por electroforesis en gel de agarosa 1.5 % del ARN extraído a partir de los serotipos extraídos.
- F. **Método estadístico.** Se utilizara la Prueba de Fisher, análisis de varianza, tabla de ANOVA utilizando el método por diseños de bloques al azar. ³²⁻³⁴
- G. **Área de Estudio.** El ensayo se realizara en los laboratorios de CENSALUD
- H. **Criterios de selección.** Para la selección de la muestra, se utilizara los siguientes **criterios de inclusión:** 1. Muestra en estado huevo, larva, hembra adulta, 2. Misma especie de *Aedes Aegypti* 3. Igual número de huevos, larvas y adultas hembras en cada recipiente, 4., 7. Igual observación a las 24 hrs, 8. Condición ambiental adecuada. Entre los **criterios de exclusión**, están: 1. Muestra contaminada. 2. Diferente especie diferente a la descrita en los recipientes, 3. Mal dilución o concentración técnica PCR, 4. Testigo otra especie, 5. Desigualdad en las observaciones, 6. Tratamiento inadecuado, 9. Condiciones ambientales inadecuadas.
- I. **Sesgos:** Carga viral disminuida, mal identificación morfológica, mal uso de la técnica PCR.

j. Extracción de ARN viral y síntesis de ADN *

"El sobrenadante (125 µL) de cultivos infectados se mezclara con 375 µL de Trizol (*Invitrogen Corp.*) y se incubara a temperatura ambiente por 5 min. Al término se adicionaran 100 µL de cloroformo y después de extracción se centrifugó a 12 000 rpm. La fase acuosa recuperada se mezcla con 250 µL de isopropanol y luego de centrifugación a 12 000 rpm el precipitado se lavó con 500 µL de etanol 75 % y se seca a temperatura ambiente. El ARN viral se resuspendió en 50 µL de agua tratada con dietil-pirocarbonato (DEPC) y luego se almacenó a - 70 °C. Para síntesis de ADN se usaron 5 µL del ARN extraído que se adicionaron a una mezcla de reacción que contenía 200 µM de cada dNTP, 0,5-1,0 µM de iniciadores anti-sentido, 1 mM de MnCl₂, 0,25 U de enzima *Tth* DNA Polimerasa (*Promega*), 2,5 µL de *buffer*, en un volumen final de 25 µL. La reacción se llevó a cabo a 90 °C por 2 min y luego a 60 °C por 30 min. "

RSS - PCR

Virus de referencia y aislados locales de cada serotipo se hará uso modificando los protocolos descritos por *Harris* y otros⁵ y *Miagostovich* y otros. Brevemente, 10 µL de ADN viral copia se adicionaron a una mezcla de reacción que contenía 2 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,35-0,8 µM de los iniciadores, 5 µL de *buffer* quelante, 0,25 U de *Tth* DNA Polimerasa (*Promega*), 5 µL de *buffer* de enzima, en un volumen final de 50 µL. La amplificación se realizó por 32 ciclos de 94 °C por 1 min, 54 °C por 1 min y 72 °C por 2 min con una extensión final a 72 °C por 10 min. El ARN de cada cepa fue amplificado por más de una vez para confirmar la reproducibilidad del resultado.



Subtipo RSS- PCR

Los productos de la amplificación se analizaran mediante electroforesis en gel de agarosa 2 % disuelto en tampón trisborato-EDTA (Tris-HCl 89 mM pH 8, ácido bórico 89 mM, EDTA 2,5 mM) y usando un estándar de tamaños de 100-pb (*DNA ladder. Promega*). En un mismo gel se colocaron 15-20 μ L tanto de los amplificados obtenidos con virus locales como con los de referencia del mismo serotipo. Para determinar el subtipo se comparó el patrón electroforético (tamaño y número de fragmentos) generado por la cepa local *versus* la prototipo.

TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y AMPLIFICACIÓN POR RT-PCR

Se utilizara el procedimiento por Harris et al, por la técnica multiplex RT-PCR para la transcripción reversa y amplificación del ARN viral utilizando set según fabricante.

-
- ♦ Fabian y otros. **Subtypes of dengue virus serotypes 2, 3 and 4 isolated in Santander District, Colombia. 2007**

Cronograma 2012

ACTIVIDADES	ENE	FEB	MAR	ABRI	MAY	JUN	JUL	AG
Definición del tema de investigación	XXX							
Revisión de literatura	XXX							
Elaboración de anteproyecto	XXX							
Revisión de asesores		XXX						
Presentación y defensa		XXX						
Pruebas en laboratorio			XXX					
Fase de campo / Toma de			XXX					



muestras								
Fase de laboratorio / Análisis de muestras				XXX				
Análisis estadístico de datos					XXX			
Discusión de resultados					XXX	XXX		
Entrega de documento final para revisión						XXX		
Presentación del trabajo final						XXX		
Entrega de documento final							XXX	

Presupuesto (BORRADOR ESTIMADO)

Material y equipos	Unidad	Costo Unitario	Costo total
Termoreciclador	1	500	500
Centrifuga PCR	1	600	600
Tubos cónicos	100	5	500
Micropipetas	2	50	100
Gradillas	2	30	60
Reactivos		300	300
Alcohol etílico			
Cloruro de magnesio buffer			
Kit RT-PCR	1	900	900
OTROS IMPREVISTOS			
TOTAL			\$5000 APROX.



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Frederickson, E. Christian. 1993. Bionomía y control de *Anopheles albimanus*. OPS Publicación Científica No 34.
2. O.M.S. 1987. Vector control in Primary Health Care. No 765. Geneva.
3. MSPAS. Reportes Epidemiológicos de 1980-1996
4. Rubio Moran, R. 1994. Parasitología y Entomología Médica. 1ª edic. México. 65: 439-437.
5. López, F.J. 1990. Microscopic diagnosis of malaria parasites in the blood. "Diagnosis in Malaria" Public. Cientif. 512: 37-47
6. Koneman, Allen. 1996. Diagnóstico Microbiológico. 3ª edic. 15: 746-747
7. Jawetz. 1996. Microbiología Médica. 15 edic.
8. Breeland, S. 1972. Studies on the ecology of *Anopheles albimanus* based in reduced sensitivity of acethyl cholinesterase. J. Entomology 68: 295-297.
9. Brow, A.W. 1972. Beingolea, O. 1977. Consideraciones sobre control biológico y predación. Revista Peruana de Entomología Agrícola. 20 : 33-47
10. Brown, A. W. 1972 .Alternative Methods of vector control. Vector control and the recrudescence of vector-Borne. Diseases. Washington. D.C. PP 59-63
11. Brown, H.W. 1991. Protozoarios de la sangre y tejido del hombre-mosquito. Parasitología clínica. 5ª edic. nueva Interam. México. 84: 278-287
12. OPS. 1992. Guías técnicas de control físico y Aplicación de insecticidas en los programas de Malaria. Nicaragua.
13. MSPAS. 1992. Aspectos generales del Programa de Malaria.
14. De Bach, P. 1987. Control Biológico de las Plagas de insectos y malas hiervas. 13 edic. edit. Continental.
15. King, A. S. 1984. Las plagas de invertebrados de cultivos anuales alimenticios en América central. Costa Rica.
16. Melgar, M. 1996. Tendencias modernas en el control de vectores y problemas asociados al uso de insecticidas en el control de vectores de malaria y dengue en El Salvador.
17. OMS. 1994. Aplicación de la estrategia mundial de lucha antipalúdica. Managua. Informe técnico. No 839.
18. Bruce, J. 1987. Malaria and its control. Annual review of publica health 8: 75-100.
19. OMS. 1987. Weekly epidemiological Record. Geneva.
20. Brow, A. 1986. Insecticide resistance in mosquitoes: a Pragmatica review, J. Mosquitos control Assoc.
21. Georghiou, G. 1972. Studios on resistance to carbamate and organophosphate insecticides in *Anopheles albimanus* :J.A. Trop Medicine. 21: 790-806
22. Lowe, R. & others. 1980- Field and laboratory assessment of temphos for larval control of *Anopheles albimanus* in El Salvador and evidence for resistance. Mosqu. News 40: 418-423.
23. Ayad, H. % others. 1975. Resistance to organophosphates and carbamates in *Anopheles albimanus* based on reduced sensivity of acethyl cholinesterase. J. Entomology. 68: 295-297.
24. Asman. S. & others. 1981. Field studies of the genetic control systems of mosquitoes annual review entomology. 26: 289-318.
25. Ventura, Portillo. B y Matamoros, D.1997. Dosificación de A. Indica para el control del "Gusano cogollero" en el cultivo de maíz. UES.
26. García, E.M. 1988. Estudio y desarrollo y aplicación de extractos acuosos en el combate de plagas y enfermedades de cultivos agrícolas.
27. Munch, E. L. 1988. Plantas con propiedades plaguicidas. Posibilidades para el Departamento de Choluteca. Honduras.
28. Saxena, R.C. & others. 1984. Evaluations and utilizations of Neem agains the rice brown. Planthopper. 77: 502-507.
29. Chumutterer, H. 1984. Natural Pesticides from the Neen tree and other tropical plants. Germany.