

Comunicación corta

Detección del virus Guanarito mediante la técnica de RT-PCR en un solo paso

Maricruz del Valle Ríos Velásquez, Meybe Carolina Saavedra Rodríguez*, Fabiola Del Ventura Villarroel, Rosa Alba Salas Mora

Gerencia Sectorial de Diagnóstico y Vigilancia Epidemiológica. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Caracas, Venezuela.

Recibido 2 de febrero de 2017; aceptado 10 de octubre de 2017

Resumen: Se estandarizó una RT-PCR en un solo paso para la detección del virus Guanarito (VGTO), con el propósito de sustituir la técnica de cultivo celular, empleada para el diagnóstico de la fiebre hemorrágica venezolana, y minimizar el riesgo biológico por exposición a este virus. Se diseñaron cebadores específicos para la detección del segmento S del gen de la nucleocápside de VGTO y se estandarizó un protocolo donde se analizaron 44 muestras: 18 sueros agudos, 11 macerados de tejidos y 15 sobrenadantes de cultivos en células Vero-E6 como controles positivos. Los resultados obtenidos por la RT-PCR fueron comparados con la técnica de cultivo celular, encontrándose un 100% de sensibilidad y especificidad, con valores predictivos positivos y negativos de 97,7% y 100%, respectivamente. El coeficiente de correlación de Pearson entre ambas pruebas fue de 99%. Este es el primer reporte del uso de una metodología para el diagnóstico molecular específico del VGTO en Venezuela.

Palabras clave: Virus Guanarito, RT-PCR, fiebre hemorrágica venezolana.

Detection of Guanarito virus by one step RT-PCR

Abstract: A one-step RT-PCR was standardized for the detection of Guanarito virus (VGTO), with the purpose of replacing the cell culture technique, used for the diagnosis of Venezuelan hemorrhagic fever, and to minimize the biological risk from exposure to this virus. Specific primers were designed for the detection of the S segment of the nucleocapsid gene of VGTO. A protocol was standardized where 44 samples were analyzed: 18 acute sera, 11 macerated tissues and 15 culture supernatants in Vero-E6 cells as positive controls. The results obtained by the RT-PCR were compared with the cell culture technique, finding 100% sensitivity and specificity, with positive and negative predictive values of 97.7% and 100%, respectively. The Pearson correlation coefficient between both tests was 99%. This is the first report of the use of a methodology for the molecular diagnosis specific to VGTO in Venezuela.

Keywords: Guanarito virus, RT-PCR, Venezuelan hemorrhagic fever.

* Correspondencia:
E-mail: meybesaavedra@gmail.com

Introducción

El virus Guanarito (VGTO) fue descubierto en 1991 como agente responsable de la fiebre hemorrágica venezolana (FHV) [1-3]. Este virus pertenece a la familia *Arenaviridae*, género *Arenavirus*, que incluye 19 tipos virales agrupados en dos complejos: los arenavirus del viejo mundo (Complejo LCM-Lassa), y los arenavirus del nuevo mundo (Complejo Tacaribe). Los virus Lassa, Junin, Machupo, Sabia y Guanarito se han asociado con enfermedad hemorrágica en humanos [4]. Los roedores son los principales reservorios para los arenavirus y las infecciones en humanos ocurren por contacto directo con las excretas de animales infectados.

Investigaciones epidemiológicas identificaron al roedor *Zygodontomys brevicauda* como reservorio natural del VGTO, estableciendo la circulación de este arenavirus en Venezuela [5,6].

Los arenavirus son virus envueltos, cuyo genoma consta de dos segmentos de ARN de cadena sencilla. Cada segmento codifica dos proteínas diferentes: el segmento L (7200 nucleótidos aproximadamente) codifica para una polimerasa dependiente de ARN y para la proteína de unión-zinc, y el segmento S (3500 nucleótidos aproximadamente) codifica para dos proteínas estructurales: la nucleoproteína (NP) y un precursor de glicoproteína (GPC) [4,6]. Están clasificados como agentes de riesgo biológico tipo 4, y su

manipulación solo debe realizarse en laboratorios de alta contención o nivel de bioseguridad 4 (NSB-4), utilizando equipos y procedimientos especiales [1,3,7].

El diagnóstico etiológico de la FHV, en el Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel (INHRR), se basó, desde sus inicios, en el aislamiento del virus por técnicas de cultivo celular en muestras de pacientes infectados en fase aguda. También se emplea la detección de anticuerpos de tipo IgG específicos contra este Arnavirus, la cual se realiza en muestras de suero de pacientes en fase convaleciente mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) [1,8,9]. Posteriormente, se introdujo la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) para la detección del género *Arenavirus*, sin embargo no se implementó para el diagnóstico de rutina [8,9].

Con el avance de las técnicas moleculares, y las ventajas que estas ofrecen al emplearse como herramientas diagnósticas de apoyo [10], surgió la necesidad en el INHRR de estandarizar la técnica de RT-PCR para la detección del VGTO. De esta manera es posible sustituir el aislamiento viral evitando la replicación del virus y, por consiguiente, minimizar el riesgo biológico del operario, garantizando un diagnóstico rápido y la transferencia tecnológica a los laboratorios de las zonas endémicas [7-9].

Materiales y métodos

Diseño de cebadores: Se usaron 12 secuencias parciales del segmento S de la nucleocápside del VGTO, depositadas en GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI, consultado en febrero de 2016), correspondientes a 12 cepas prototipo del VGTO. Mediante el programa BioEdit 7.0.5.3 se realizó la búsqueda de la secuencia consenso. Se empleó el programa Oligo Explorer 1.1.2. para el diseño de los cebadores que amplificaran un fragmento del segmento S de la nucleocápside del VGTO de longitud de 589 pb, según una secuencia consenso y tomando en cuenta los siguientes parámetros: longitud del cebador, temperatura de hibridación, formación de dímeros, contenido de GC y tamaño del amplificado. El alineamiento de las secuencias se realizó con MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation). En la tabla 1 se muestra la secuencia de los cebadores.

Selección de muestras: De la base de datos del Laboratorio de Aislamiento Viral del INHRR se seleccionaron muestras de suero y tejidos macerados de pacientes, con diagnóstico confirmado de FHV por aislamiento viral mediante la técnica de cultivo celular, en el período correspondiente a

los años 2005-2010. Estas muestras pertenecen al programa de vigilancia epidemiológica de la FHV, enfermedad de notificación y denuncia obligatoria en Venezuela. Como controles positivos se incluyeron 15 sobrenadantes de cultivo de células Vero-E6 infectados con cepas de este virus, confirmados mediante IFI con un antisuero mono específico de referencia para el VGTO producido en líquido ascítico [8,9]. Las muestras seleccionadas fueron clasificadas según el tiempo de viremia o convalecencia, para realizar los distintos ensayos que se describirán posteriormente, y su utilización contó con la aprobación de la Gerencia de Diagnóstico y Vigilancia Epidemiológica del INHRR.

Extracción de ácidos nucleicos: La extracción del ARN viral se realizó con el estuche comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN), siguiendo las indicaciones del fabricante. La etapa inicial de este procedimiento, que corresponde a la lisis de células e inactivación del virus, se realizó en un laboratorio con nivel de bioseguridad 3 (NSB-3) [9].

RT-PCR en un solo paso: Se diseñó un protocolo de transcripción reversa y amplificación en un solo paso para la detección de segmento S de la nucleocápside del VGTO, empleando el estuche comercial Super Script III One Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen™) y se añadieron los cebadores específicos a una concentración de 10 µM, para un volumen final de mezcla de 45 µL, a los cuales se les añadió 5 µL del ARN extraído. La reacción se realizó en un termociclador GeneAmp® PCR 9700 (Applied Biosystems), bajo las siguientes condiciones: transcripción reversa a 55 °C por 60 min, desnaturalización a 94 °C por 2 min, seguidos de 35 ciclos de amplificación: desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 52 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 90 s, con una extensión final de 72 °C por 10 min. Como control positivo se utilizaron sobrenadantes de cultivo confirmados por IFI con anticuerpos monoclonales específicos para el VGTO [8,9].

El producto obtenido se observó posterior a la realización de una corrida electroforética en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio al 0,1 mg/mL (Bio-Rad). Las bandas correspondientes a los productos amplificados se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta PhotoDoc-It™ Modelo 65 (UVP), siendo el tamaño esperado del amplificado de 589 pb.

Ensayos realizados:

1) **Evaluación de la sensibilidad de la RT-PCR vs. cultivo celular:**

1.1) Se analizaron 29 muestras con resultados positivos por la técnica de cultivo celular (18 sueros y 11 tejidos macerados: hígado, pulmón y corazón). Este ensayo tuvo como objetivo demostrar correlación entre los resultados obtenidos por el cultivo celular y la RT-PCR propuesta, y a su vez, demostrar la capacidad de detección del VGTO por la RT-PCR en muestras primarias, donde la carga viral es menor a la presente en los sobrenadantes de cultivo.

Tabla 1. Secuencias de cebadores para amplificar el segmento S de la nucleocápside del VGTO.

Cebador	Secuencia	Posición
UGtov	5'-ACA GTT CAG GGA GGA GAA AC-3'	552- 572
LGtov	5'-TGT CCA TCC AGA TTG TGT C-3'	1141-1123

Adicionalmente, se analizaron 15 sobrenadantes de cultivo positivos para el VGTO cuyas muestras primarias fueron las mencionadas anteriormente.

1.2) Se analizaron 9 muestras de suero obtenidos en la fase aguda de la enfermedad, en las cuales no se logró el aislamiento viral por la técnica de cultivo celular, pero cuyos casos fueron confirmados como positivos al detectar los anticuerpos de tipo IgG contra el VGTO en muestras de fase convaleciente de la enfermedad recibidas posteriormente.

2) *Determinación del tiempo de viremia*: Se analizaron 38 muestras: 27 sueros y 9 de tejidos macerados de pacientes, obtenidos entre los días 1 al 13 de evolución de la enfermedad. Con este ensayo se pudo evaluar la capacidad de la técnica para detectar la presencia del VGTO en distintos periodos de la etapa de viremia, según lo descrito en la literatura [8,9] y los registros del laboratorio del INHRR sobre pacientes con diagnóstico de FHV; adicionalmente, permitió confirmar el límite de días de la toma de muestras para la realización del diagnóstico de FHV por la técnica de RT-PCR.

3) *Evaluación de la especificidad de la RT-PCR*: Se utilizaron muestras de sobrenadantes de cultivo de células Vero E6 infectados con virus pertenecientes a las familias: Arenaviridae (Amapari y Pirital), Bunyaviridae (Caño Delgadito y Hantaan), Flaviviridae (Fiebre Amarilla, Dengue), Togaviridae (UNA, Mayaro, Encefalitis Equina Venezolana, Encefalitis Equina del Este y Rubeola), Herpesviridae (Herpes Simplex I) y Picornaviridae (Enterovirus). Estos virus fueron aislados en el Laboratorio de Aislamiento Viral del INHRR. El ensayo tuvo como objetivo evidenciar la hibridación inespecífica de los cebadores con virus de diferentes familias. Se incluyeron los hantavirus por ser agentes que co-circulan con los arenavirus en las zonas endémicas y los flavivirus por causar enfermedad clínica similar a la FHV y ser los principales agentes en el diagnóstico diferencial, mientras que el virus Rubeola se incluyó como enfermedad exantemática importante en el diagnóstico diferencial de los síndromes febriles. Asimismo, se incluyeron otros arenavirus cuya circulación se ha comprobado en el país [5,6].

Análisis estadístico: Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson para la comparación de la técnica de cultivo celular contra la RT-PCR y medir su grado de correlación. Se utilizaron tablas de contingencia para calcular la sensibilidad (S), valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) y la especificidad (E), siendo la sensibilidad la fracción de verdaderos positivos y la especificidad la fracción de verdaderos negativos; además, se calcularon los errores mayores (EM) y errores graves (EG) de la RT-PCR estandarizada. Los EM fueron identificados como aquellos resultados positivos por cultivo celular que resultaron negativos por la RT-PCR y los EG fueron aquellos resultados negativos por cultivo celular que dieron positivos por la RT-PCR [11].

Resultados y discusión

Sensibilidad de la RT-PCR vs. cultivo celular: Resultaron positivas 43 de las 44 muestras analizadas tanto por cultivo celular como por la RT-PCR propuesta. Una muestra de suero resultó negativa por cultivo celular pero positiva por la RT-PCR. Con la RT-PCR se logró detectar el VGTO en todos los tipos de muestras ensayadas: sueros, macerados de tejidos y sobrenadantes de cultivo (Figura 1), lo que indicó que esta PCR puede ser utilizada en estos tipos de muestras. Se encontró una asociación estadísticamente significativa al comparar los resultados por ambas técnicas ($p < 0,05$), por lo tanto, se puede afirmar que la RT-PCR en un solo paso puede ser usada para el diagnóstico de la FHV. Se obtuvieron valores de $S=100\%$, $E=100\%$, $VPP=97,7\%$ y $VPN=100\%$. Por otra parte, un VPN igual a 100% para la RT-PCR la convierte en una técnica de elevado valor diagnóstico, ya que un resultado negativo por esta prueba excluye la presencia de la enfermedad. Es importante señalar que se han reportado otros métodos diagnósticos para detectar al Arenavirus, sin embargo no son capaces de identificar la especie del VGTO, solo el género [8,9,12]. Este es el primer reporte del uso de una PCR convencional con cebadores específicos para el VGTO, que permite la identificación de este virus autóctono venezolano.



Figura 1. Muestras positivas confirmadas por IFI para el VGTO ensayadas con la RT-PCR One Step. El tamaño específico de las bandas es de 589 pb. Líneas 1 a 4: muestras de sueros agudos. Línea 5: control negativo (Agua destilada). Línea 6: muestra de macerado de pulmón. Línea 7: muestra de macerado de hígado. Línea 8: muestra de macerado de corazón. Líneas 9 y 10: control negativo (Agua destilada). Líneas 11 a 13: muestras de sobrenadantes de cultivo. Línea 14: marcador de peso molecular de 100 pb.

No se obtuvieron EM mientras que si se presentaron EG en un 2,3% de las muestras (una muestra negativa por cultivo celular pero positiva por RT-PCR). El coeficiente de correlación entre ambas pruebas fue del 99%, lo que indicó que los métodos estudiados son similares y pueden utilizarse de forma indistinta.

El cultivo celular se considera como la técnica de

referencia para el diagnóstico de los virus cultivables, debido a que se produce la replicación viral en las células y con esto se establece inequívocamente la presencia de la enfermedad, en cambio, la RT-PCR es capaz de detectar material genético del virus aunque el mismo no sea capaz de infectar una célula, representando una técnica valiosa en la detección de bajas concentraciones del virus [8,9,12]. Adicionalmente, la RT-PCR permite minimizar el riesgo de exposición del analista y del medio ambiente a elevadas concentraciones del virus, en contraste con la exposición generada por la técnica de cultivo celular y la necesidad de instalaciones de contención durante el proceso de replicación.

Se compararon los resultados de cultivo celular y RT-PCR obtenidos con muestras de IgG positivas para el VGTO, donde se detectó la presencia del virus en 5/9 (55,6%) de las muestras analizadas. De esta manera, se confirmó la ventaja que ofrece la técnica de RT-PCR como herramienta diagnóstica para detectar el genoma del VGTO, dejando en evidencia su elevada sensibilidad. El resto de las muestras en las cuales no se detectó el ARN del VGTO, y su falta de correlación con los resultados del cultivo celular, indicó que probablemente fueron obtenidas después de la etapa de viremia, es decir, la producción de anticuerpos específicos causó la neutralización del virus.

Evaluación del período de viremia: Se demostró la capacidad de la técnica para detectar la presencia del VGTO durante diferentes momentos en la etapa de viremia, según la fecha de inicio de síntomas registrada en la ficha epidemiológica. El estudio publicado por el INHRR y el Centro de Investigación de Virosis Hemorrágicas (CIVIHET) del estado Portuguesa, estableció hasta 10 días, luego del inicio de los síntomas, como el período de viremia para las infecciones por arnavirus [9]; igualmente los registros de laboratorio del INHRR indicaron que la mayoría de los pacientes con FHV tienen un período de viremia de 10 días (datos no publicados). Sin embargo, en este estudio se logró detectar el VGTO en una muestra de suero tomada el día 13 del inicio de los síntomas, lo que posiblemente indicaría un período de viremia mayor al establecido previamente.

Durante esta evaluación se detectó el VGTO en muestras colectadas desde el día 1 del inicio de los síntomas hasta el día 10, con un pico en las muestras colectadas el día 6. Se mantiene la recomendación del procesamiento de muestras agudas obtenidas hasta el día 10 a pesar de la detección del virus en una muestra del día 13, por requerir estudios con una mayor cantidad de muestras que soporten este hallazgo.

Especificidad de la RT-PCR de VGTO: No se obtuvo amplificación con los controles utilizados correspondientes a los virus de las distintas familias ensayadas, lo que indicó que la técnica de RT-PCR estandarizada es específica para la detección del segmento S del gen de la nucleocápside del VGTO. Estos cebadores detectan todas las cepas conocidas del VGTO.

Este es el primer reporte de una PCR convencional para

la identificación del VGTO en Venezuela. Es una técnica sencilla que puede ser transferida a centros diagnósticos ubicados en zonas endémicas.

Agradecimientos

Los autores agradecen a todo el personal auxiliar, técnico y profesional médico y del laboratorio que a través de los años han participado en el diagnóstico e investigación de la Fiebre Hemorrágica Venezolana, quienes han hecho posible la materialización de los datos mostrados en esta publicación.

Conflictos de interés

Los autores manifiestan que no tienen conflictos de interés en este artículo.

Referencias

1. Salas RA, De Manzione N, Tesh R, Rico-Hese R, Shope R, Betancourt A, *et al.* Venezuelan hemorrhagic fever. *Lancet*. 1991; 338:1033-9.
2. De Manzione N, Salas RA, Paredes H, Godoy O, Rojas L, Araoz F *et al.* Venezuelan hemorrhagic fever: clinical and epidemiological studies of 165 cases. *Clin Infect Dis*. 1998; 26:308-13.
3. Tesh RB, Jahrling PB, Salas RA, Shope R. Description of Guanarito virus (Arenaviridae: *Arenavirus*), the etiologic agent of Venezuelan hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*. 1994; 50:452-9.
4. Charrel R, Feldmann H, Fulhorst C, Khelifa R, De Chesse R, Lamballerie X. Phylogeny of New World arenaviruses based on the complete coding sequences of the small genomic segment identified an evolutionary lineage produced by intrasegmental recombination. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 296:1118-24.
5. Fulhorst CF, Bowen M, Salas RA, Duno G, Utrera A, Ksiazek T, *et al.* Natural rodent host associations of Guanarito and Pirital viruses (Family Arenaviridae) in central Venezuela. *Am J Trop Med Hyg*. 1999; 61:325-30.
6. Fulhorst C, Cajimatb M, Milazzo M, Paredes H, De Manzione N, Salas RA, *et al.* Genetic diversity between and within the arenavirus species indigenous to western Venezuela. *Virology*. 2009; 378:205-13.
7. Racsá L, Kraft C, Olinger G, Hensley L. Viral hemorrhagic fever diagnostics. *Clin Infect Dis*. 2016; 62:214-9.
8. Ministerio para el Poder Popular para la Salud. Viceministerio de Redes de Salud Colectiva. Fiebre Hemorrágica Venezolana. 2012. Versión 2.0.
9. Vásquez C, Salas RA, De Manzione N, Paredes H, Tesh R. Fiebres hemorrágicas por Arnavirus en Venezuela. *Vitae Academia Biomédica Digital*. 2005; 21. Disponible en: http://vitae.ucv.ve/pdfs/VITAE_2963.pdf. Acceso: 27 abril 2017.

10. Bolívar AM, Rojas A, García-Lugo P. PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en Biomedicina*. 2014; 3:25-33.
11. Medina MC. Generalidades de las pruebas diagnósticas y su utilidad en la toma de decisiones médicas. *Rev Colomb Psiquiat*. 2011; 40:787-97.
12. Bowen MD, Peters CJ, Nichol, ST. The phylogeny of New World (Tacaribe complex) arenaviruses. *Virology*. 1996; 219:285-90.