

DETECÇÃO E TIPAGEM DE VÍRUS DENGUE SOROTIPOS 1 E 2 POR MULTIPLEX RT-PCR

Maria Luisa BARBOSA*

RIALA 6/855

BARBOSA, M.L. - Detecção e Tipagem de Vírus Dengue Sorotipos 1 e 2 por Multiplex RT-PCR. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 58 (1): 79-83, 1999.

RESUMO: Os vírus Dengue são arbovírus da família Flaviviridae, com 4 sorotipos antigenicamente distintos. Variações genéticas intraespecíficas entre os mesmos sorotipos, inclusive em uma mesma epidemia, estão bem estabelecidas. O desenvolvimento da técnica de polimerização em cadeia (PCR) é uma alternativa na identificação dos vírus Dengue. Neste estudo construímos dois novos pares de *primers* para os sorotipos 1 e 2, sem a ajuda de programas de computador. Foram utilizadas como modelo as seqüências genômicas de DEN-1 (Western Pacific), Nauru Island e DEN-2 New Guinea C. Os *primers* sense 5' ACA AAA AGT GGA GAC CTG GGC TC 3' (D1S) e complementar 5' GTC TAT TCC AAG TCT CTT GGG 3' (D1A) correspondem respectivamente às posições 769 a 791 e 1607 a 1587 do genoma do vírus DEN-1. Estas seqüências reconhecem parte das regiões de membrana (M) e proteína estrutural (E) do genoma do sorotipos 1 e contem 838 pares de bases. A seqüência de *primers* de DEN-2 foi 5' TGA AGG GGA CGG TTC TCC ATG T 3' (D2S) homólogos aos nucleotídeos 1838 a 1859 e 5' GAC TCC CAC CAA TAC TAG TGA CAC 3' (D2A) correspondendo às posições 2312 a 2288. O produto da amplificação foi de 474 pares de bases correspondendo a uma porção do genoma responsável pela síntese da proteína E. A especificidade dos *primers* foi avaliada por multiplex RT-PCR.

DESCRITORES: Dengue, RT-PCR Multiplex, *Primers*,

INTRODUÇÃO

A introdução dos diversos sorotipos do vírus Dengue (DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4), em muitas regiões do mundo, vem ocorrendo devido à urbanização dos trópicos, ineficiência dos programas de saúde pública sobretudo no controle do vetor (mosquito) e em decorrência de problemas econômicos e sociais, vividos por países localizados em regiões propícias ao aparecimento do vetor e conseqüentemente do vírus responsável pela doença. A dengue é, mundialmente, a mais importante doença viral, transmitida por artrópodes, em termos de mortalidade e morbidade^{2,4}.

O aperfeiçoamento de metodologias, para a detecção de vírus, se faz necessário não só para o diagnóstico,

como para a vigilância epidemiológica. Assim, para o diagnóstico do vírus Dengue, a utilização de técnicas de biologia molecular tem resultado no desenvolvimento de testes rápidos, sensíveis e específicos.

A técnica de polimerização em cadeia (Polymerase Chain Reaction- PCR)^{11,14} é uma alternativa, na identificação dos vírus Dengue, pois em algumas horas pode-se obter grande quantidade do material genético de vírus, provenientes de amostras de soro, lesões teciduais ou culturas celulares infectadas com os vírus¹². Este material pode, então, ser analisado por sequenciamento genômico, testes de hibridização, eletroforese em gel de agarose ou ainda por padrão de restrição enzimática^{6,13,7,1,9,10}.

O teste de PCR envolve a escolha correta de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que se ligam especifi-

* Instituto Adolfo Lutz - Av. Dr. Arnaldo, 355 - CEP 01246-902 - São Paulo SP - Brasil.

camente ao ácido nucléico que será amplificado. Os ciclos são repetidos e consistem de desnaturação do DNA, anelamento e extensão do *primer* pela DNA polimerase. Desta forma os oligonucleotídeos são fatores determinantes para o sucesso ou falha na amplificação do DNA.

Com a finalidade de identificar especificamente DEN-1 e DEN-2, em uma única etapa de PCR, construímos 2 pares de *primers* para estes sorotipos.

MATERIAL E MÉTODOS

Os *primers* foram elaborados utilizando-se como molde as seqüências das linhagens Western Pacific (Nauru Island) para DEN-1⁸ e New Guínea C para DEN-2³ e gentilmente sintetizados pela Dra. Luíza L.Villa, do Instituto Ludwig de São Paulo. Foram analisadas as regiões do genoma correspondentes às proteínas de capsídio (C), pré membrana (prM), membrana (M) e envelope (E). Durante todo o estudo as seqüências dos 2 genomas foram comparadas fração a fração, nucleotídeos 410 a 2392 e 342 a 2345 para DEN-1 e DEN-2, respectivamente, e vários segmentos escolhidos como prováveis "primers". A elaboração destes oligonucleotídeos foi realizada sem a ajuda de programas de computador; as seqüências foram avaliadas e determinadas manualmente.

RNA VIRAL

Os testes foram realizados com RNA viral purificados a partir dos 4 sorotipos de Dengue (provenientes do CDC), RNA padrão Gibco e água MilliQ como controle negativo. A especificidade dos "primers" foi analisada por multiplex RT-PCR.

Síntese de cDNA

Os RNAs alvo (DEN-1, DEN-2 e controles) foram convertidos em cDNA (DNA cópia), a partir de uma fração de 5 µl de cada RNA diluído 1:100 em água e acrescentado 25 µl da mistura: 9,0 µl de H₂O; 5,0 µl de tampão de enzima 5 vezes concentrado; 1,0 µl de RNasin a 10 U/µl; 3,0 µl de MgCl₂ a 25 mM; 2,0 µl de DTT a 0,1 M; 0,5 µl de cada *primer anti-sense* (D1A e D2A) a 20 µM; 2,0 µl de dNTP a 10 mM; 2,0 µl de transcriptase reversa a 20 U/µl (RT - Superscript, GIBCO). A mistura foi incubada a 42 °C / 1 hora seguida de outra incubação a 95 °C/7 minutos.

Amplificação do cDNA

A reação de polimerização em cadeia¹⁴ foi realizada com 10 µl do produto contendo cDNA acrescido de 40 µl da mistura: 27,8 µl de H₂O; 2,5 µl de tampão de enzima 10 vezes concentrado; 3,5 µl de MgCl₂ a 25 mM; 1,0 µl de cada *primer sense* (D1S e D2S) e *anti-sense* (D1A e D2A) a 20 µM; 2,0 µl de dNTP a 10 mM; 0,2 µl de Taq DNA Polimerase a 5U/µl. Inicialmente a denaturação do cDNA-RNA híbrido foi feita à 94 °C/5min. seguida de 35 ciclos com os seguintes passos: 94 °C/50seg. 50 °C/40seg. 72 °C/40seg. e 72 °C/7 minutos.

Após a amplificação, os produtos (5µl) foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em tampão TAE (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA), o gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em luz UV.

RESULTADOS

Os "Primers" foram determinados por apresentarem conteúdo de C-G entre 45 e 55%, seqüências de bases com maior número de diferenças, entre os dois sorotipos em estudo, número máximo de bases inferior a 25 e temperatura de fusão (T_m) semelhantes entre os 4 *primers* analisados. Observando-se estas características foram definidos os seguintes oligonucleotídeos.

D₁S → 5'ACA AAA AGT GGA GAC CTG GGC TC 3'
nucleotídeos 769 a 791, oligonucleotídeo *sense*

D₁A → 5'GTC TAT TCC AAG TCT CTT GGG 3'
nucleotídeos 1607 a 1587, oligonucleotídeos *anti-sense*

D₂S → 5'TGA AGG GGA CGG TTC TCC ATG T 3'
nucleotídeos 1838 a 1859 oligonucleotídeo "sense".

D₂A → 5'GAC TCC CAC CCA ATA CTA GTG ACAC 3'
nucleotídeos 2312 a 2288 oligonucleotídeo não "sense".

O tamanho da seqüência do DNA amplificado foi consistente com o esperado para a região alvo do genoma dos vírus DEN-1 e DEN-2, os fragmentos resultantes correspondem a 838 pares de bases para o sorotipo 1 e 474 para o sorotipo 2 (Figuras 1).

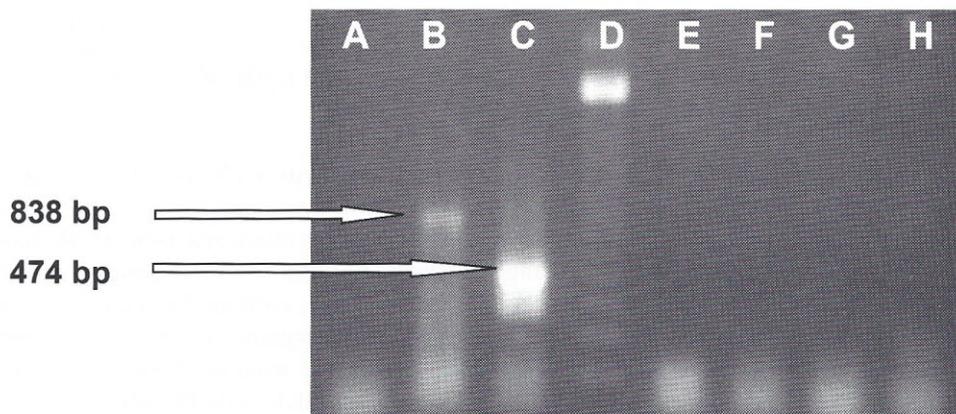


FIGURA 1: Gel de agarose empregado na análise dos produtos de RT-PCR dos Genomas padrões de vírus Dengue: (a) reagentes; (b) DEN-1; (c) DEN-2; (d) padrão peso molecular 100 bp ladder GIBCO BRL; (e) DEN-3; (f) DEN-4; (g) RNA controle; (h) H₂O controle.

DISCUSSÃO

O desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase (PCR) tem facilitado o diagnóstico e detecção dos vírus Dengue. Uma das principais considerações nos protocolos de PCR está na obtenção de produtos específicos determinados pelos “primers”.

Embora a padronização da PCR envolva muitas variáveis, um dos parâmetros mais críticos, em todos os casos, é a obtenção de “primers”, que se ligam especificamente ao ácido nucléico em estudo, resultando em produtos específicos. Assim a etapa fundamental na construção de um “Primer”, é assegurar esta especificidade.

Relatos anteriores têm descrito que a mistura de “primers” específicos possibilita a amplificação dos vírus Dengue, usando técnicas de hibridização, “Nested” ou ainda amplificação de parte do genoma após a digestão com enzimas de restrição. A utilização destes novos “primers” permitiu a amplificação do cDNA em uma única etapa.

A tipificação em uma etapa de PCR, reduz sensivelmente o risco de contaminação, pois neste processo não é necessária a manipulação de cDNA amplificado inter-

mediário. Esta simplificação representa uma vantagem sobre o método empregando “nested” cujos resultados são obtidos após uma segunda etapa de amplificação e hibridização que requer sonda marcada, purificada e padronizada, às vezes de difícil reprodução.

A especificidade de nossos “primers” foi revelada por sua habilidade em reconhecer seqüências específicas únicas de RNA de cada um dos sorotipos 1 e 2, não se observando qualquer cruzamento entre os 2 sorotipos em estudo e completa ausência de amplificação com os sorotipos 3 e 4. Somente um produto foi obtido em cada reação de tipificação.

Variações genéticas intraespecíficas entre as viroses por dengue, mesmo em áreas epidêmicas, estão bem estabelecidas¹⁵. Desta forma o sucesso obtido na amplificação dos vírus Dengue sorotipos 1 e 2 isolados, em culturas celulares, representa a perspectiva para que em um futuro próximo esta metodologia possa ser utilizada em amostras de soro de pacientes, permitindo um diagnóstico, além de específico, mais rápido e sensível na detecção dos vírus circulantes em nosso meio.

BARBOSA, M.L. - Multiplex RT-PCR used for detection and tipification of Dengue viruses serotypes 1 and 2. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 58 (1): 79-83, 1999.

ABSTRACT: Dengue Virus is a mosquito-borne flavivirus with four antigenically distinct serotypes. Intratypic genetic variation among the virus serotypes, even in the same epidemic, is well established. The development of the polymerase chain reaction (PCR) has facilitated the diagnostic assays in detecting dengue viruses. In order to detect dengue viruses circulating in Brazil, two new pairs of type-specific primers were, without the aid of any computer program, manually designed. We used as model genomic sequence of the DEN-1 (Western Pacific strain), Nauru Island and DEN-2, New Guinea C were used as model. The genomic-sense, 5' ACA AAA AGT GGA GAC CTG GGC TC 3', oligonucleotide primers (D1S) and the 5' GTC TAT TCC AAG TCT CTT GGG 3' (D1A) oligonucleotide complementary to the plus-strand corresponded respectively to the positions 769 to 791 within 5' non coding region of the DEN-1 virus genome and 1607 to 1587. These primer sequences bracketed at 838 nucleotides base sequence in the M and E gene. The sequence sense primers of DEN-2 was 5' TGA AGG GGA CGG TTC TCC ATG T 3' (D2S) homologous to nucleotides 1838 to 1859 and the 5' GAC TCC CAC CAA TAC TAG TGA CAC 3' (D2A) oligonucleotide used for the first-strand cDNA synthesis was designed to contain complementary sequences to the original RNA at 3' end, corresponding to positions 2312 to 2288. The amplification product has a 474bp size corresponding to E gene portion. The primer specificity were evaluated by the multiplex RT-PCR.

DESCRIPTORS: Dengue, Multiplex RT-PCR, Primers.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CHANDLER, L.J.; BLAIR, C.D. & BEATY, B.J. Detection of Dengue-2 viral RNA by reversible target capture hybridization. *J. Clin. Microbiol.*, **31**: 2641-2647, 1993.
2. GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever In: *The Americas. Puerto Rico Health Sci. J.* **6**: 107-111, 1987.
3. GRUENBERG, A.; WOO, W.S.; BIEDRZYCKA, A. & WRIGHT, P.J. Partial nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the structural proteins of dengue type 2, New Guinea C and PVO-218 strains. *J. Gen. Virol.* **69**: 1391-1398, 1988.
4. HALSTEAD, S.B. Pathogenesis of Dengue: Challenges to Molecular Biology- *Science*, **239**: 476- 481, 1988
5. HENCHAL, E.A.; GENTRY, M.K.; McCOWN, J.M. & BRANDT, W.E. Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **31**: 830-836, 1982.
6. HENCHAL, E.A.; POLO, S.L.; VOMDAM, V.; YAAEMSERI, C.; INNIS, B.L. & HOKE, C.H. Sensitivity and specificity of a universal primer set for the rapid diagnosis of dengue virus infections by polymerase chain reaction and nucleic acid hybridization. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **45**: 418-428, 1991.
7. LANCIOTTI, R.S.; CALISHER, C.H.; GUBLER, D.J. & VORNDAM, A.V. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, **3**: 545-551, 1992.
8. MASON, P.W.; McADA, P.C.; MASON, T.L. & FOURNIER, M.J. Sequence of the Dengue-1 virus genome in the region encoding the three structural proteins and the major nonstructural proteins NS1. *Virology*, **161**: 262-267, 1987.
9. MORITA, K.; MAEMOTO, T.; HONDA, S.; ONISHI, K.; MURATA, M.; TANAKA, M. & IGARASHI, A. Rapid detection of virus genome from imported dengue fever and dengue hemorrhagic fever patients by direct polymerase chain reaction. *J. Med. Virol.*, **44**: 54-58, 1994.
10. MORITA, K.; TANAKA, M. & IGARASHI, A. Rapid identification of dengue virus serotypes by using polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, **29**: 2107-2110, 1991.

11. MULLIS, K.B. & FALOANA, F.A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol.** **155**: 335-350, 1987.
12. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: Guidelines for prevention and control. Washington, D.C.: PAHO, 1994.
13. PURI, B.; HENCHAL, E.A.; BURANS, J.; PORTER, K.R.; NELSON, W.; WATTS, D.M. & HAYRS, C.G. A rapid method for detection and identification of flaviviruses by polymerase chain reaction and nucleic acid hybridization. **Arch. Virol.**, **134**: 29-37, 1994.
14. SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, A.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B. & ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, **239**: 487-491, 1988.
15. TRENT, D.W.; MANSKE, C.L.; FOX, G.E.; CHU, N.C.; KLIKIS, S.C. & MONATH, T.P. The molecular epidemiology of dengue viruses: Genetic variation and microevolution. **Appl. Virol. Res.**, **2**: 293-315, 1990.

Recebido para publicação em 04/08/98

