

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LAS INFECCIONES VIRALES

Maria T. Rugeles L.

Las técnicas moleculares ofrecen varias ventajas sobre los métodos clásicos de diagnóstico de infecciones virales, como el aislamiento, la visualización microscópica y las pruebas serológicas. Mediante estas pruebas se logra una mayor sensibilidad, independencia de la viabilidad del virus y rapidez. Además, por medio de estas pruebas moleculares se pueden detectar las diferentes variantes genéticas de un virus; lo que puede ser importante tanto desde el punto de vista individual como epidemiológico; además del valor taxonómico. Así mismo, los ácidos nucleicos son generalmente bastante resistentes a condiciones medioambientales adversas y al paso del tiempo, lo que ha permitido la detección de virus en muestras almacenadas en diferentes condiciones por más de 20 años. Por último se debe considerar que la detección del ácido nucleico también permite la detección de infecciones virales latentes.

En los últimos años ha sido evidente el progreso en el diagnóstico molecular de diferentes agentes infecciosos, particularmente aquellos con los cuales se ha tenido dificultad para su aislamiento. Sin embargo, existen limitaciones mayores para el uso extensivo de estas pruebas, tales como la infraestructura, la falta de personal con el entrenamiento adecuado y estrategias de sistematización que permitan la aplicación masiva de estas pruebas a diferentes tipos de muestras clínicas.

Las pruebas moleculares más utilizadas para el diagnóstico virológico pueden ser de dos tipos: aquellas que detectan el genoma viral presente en una muestra como son: el Dot blot, el Southern blot, el Northern blot y la prueba de DNA ramificado, y las que permiten la amplificación del genoma viral como son las basadas en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa o PCR.

Detección de Ácidos Nucleicos

El apareamiento específico de las bases que constituyen los ácidos nucleicos es el principio fundamental de la hibridación molecular. Los ácidos nucleicos virales son generalmente moléculas de DNA de doble cadena o cadenas sencillas de RNA (excepto en los reovirus cuyo RNA es de doble cadena y los parvovirus que están constituidos por DNA de cadena sencilla). Las cadenas dobles de ácidos nucleicos pueden ser disociadas por calentamiento o tratamiento químico pero, una vez que se restablecen las condiciones "normales" las cadenas vuelven a asociarse o hibridarse con base en su secuencia complementaria. Se podría entonces definir la hibridación como el proceso por medio del cual dos cadenas complementarias de ácidos nucleicos se aparean.

Basados en el principio de hibridación se han desarrollado diferentes pruebas para el diagnóstico viral utilizando sondas específicas de ácidos nucleicos, las cuales consisten de pedazos cortos de DNA o RNA complementarios al genoma viral. La sonda puede estar marcada directamente en forma radioactiva o con enzimas u otras moléculas reporteras como la biotina o digoxigenina que permitan su posterior identificación. En los ensayos de hibridación el ácido nucleico blanco se desnaturaliza y se une a una fase sólida como la membrana de nylon o nitrocelulosa, la cual se incuba en condiciones apropiadas con la sonda (que también se debe desnaturalizar si es de doble cadena). Después de realizar los lavados necesarios, para retirar la sonda que no reacciona, se agregan los elementos necesarios para revelar la reacción.

Dot blot: Esta prueba se considera la forma más sencilla y es la más frecuentemente utilizada. Las muestras a analizar se dispensan sobre la membrana de nylon o nitrocelulosa en un punto definido, se tratan sucesivamente con proteinasa y cloroformo para liberar el ácido nucleico y con NaOH para separar las cadenas. Una vez se fije el DNA o RNA por tratamiento térmico o con luz ultravioleta se agrega la sonda marcada, se permite que ocurra la hibridación en las condiciones apropiadas para hacer un lavado posterior y retirar la sonda que no se hibridó. La reacción de revelado va a depender de la forma como estaba marcada la sonda. En caso positivo el resultado final será una mancha sobre la muestra que contenga el material genómico buscado.

Southern blot: su nombre se asignó en honor al científico que la describió, Edward Southern, y de paso originó los nombres del Northern blot, que detecta RNA, y del Western blot que detecta proteína. Esta técnica permite la detección de secuencias específicas de DNA. Se diferencia del Dot blot en que el ácido nucleico es sometido a una electroforesis antes de ser transferido a una membrana de nylon o nitrocelulosa. El DNA que se separa electroforéticamente puede provenir de una digestión previa con enzimas

de restricción o puede ser el resultado de un proceso de amplificación genómica mediante PCR. El procedimiento de transferencia preserva la distribución de los fragmentos en el gel creando una réplica del gel en el filtro o membrana. La hibridación y el revelado son similares a los del Dot blot, pero la mancha final tomará la forma de una banda y su posición dependerá del tamaño del fragmento que contenga la secuencia de la sonda con que se hibridó. Su mayor uso ha sido en la comparación de mapas de restricción de diferentes muestras de DNA; mutaciones tipo deleciones o inserciones son frecuentemente detectadas por esta metodología al igual que diferencias en secuencias que correspondan a sitios de restricción específicos. Finalmente ha sido utilizada como herramienta diagnóstica posterior al PCR, para aumentar la especificidad de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa.

Northern blot: Esta técnica permite la detección de una secuencia específica de RNA. La muestra del ácido nucleico, que generalmente corresponde a RNA celular total, se desnaturaliza con agentes químicos, normalmente formaldehído, para prevenir la formación de puentes de hidrógeno asegurando que todas las moléculas se encuentran en su conformación lineal. En forma similar al Southern blot, los RNAs son posteriormente separados por electroforesis en gel, de acuerdo a su tamaño y luego son transferidos a la membrana de nylon o al filtro de nitrocelulosa; luego se hibrida el filtro con una sonda marcada de DNA que permite la visualización de la reacción. El uso más frecuente de esta técnica es para la comparación de cantidades de un RNAm en distintas células o en células sometidas a condiciones diferentes.

DNA ramificado (bdNA): De las pruebas de hibridación esta es la más sensible, pues permite la detección de bajas concentraciones de DNA. En este sistema se utiliza una sonda que tiene, en un extremo la parte complementaria al DNA blanco, y en el otro, múltiples ramificaciones idénticas que posteriormente se hibridarán con una segunda sonda marcada con una enzima; posteriormente se adiciona el sustrato quimioluminiscente y se cuantifica la emisión de fotones. Esta prueba puede ser cuantitativa puesto que la señal inicial se amplifica en forma proporcional a la cantidad de material genético presente en la muestra problema. A diferencia de las técnicas de PCR que amplifican los ácidos nucleicos, en esta prueba la amplificación es de la señal de hibridación; esto se vuelve importante cuando se piensa en los problemas de contaminación con DNA en el laboratorio que es una de las limitantes mayores para el uso rutinario de las pruebas de PCR en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Esta prueba se ha utilizado para el diagnóstico y cuantificación del VIH y el virus de la hepatitis C.

Amplificación de Ácidos Nucleicos

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): Esta técnica está basada en la forma de replicación de los ácidos nucleicos *in vivo*. Ha sido fácilmente implementada en el diagnóstico virológico ya que todos los virus tienen secuencias únicas y la mayoría de ellas han sido previamente reportadas. Esta técnica se basa en la repetición de tres reacciones sucesivas: la desnaturalización del DNA, que se logra con temperaturas de 94°C a 96°C por un período variable dependiendo de la complejidad del ácido nucleico a probar; la hibridación de dos oligonucleótidos específicos, llamados "primers" o iniciadores, a cada una de las cadenas molde previamente desnaturalizadas, la cual se hace a una temperatura y tiempo determinados dependiendo, entre otras cosas, de la secuencia del oligonucleótido; el último paso consiste en la extensión o síntesis de la cadena complementaria la cual se lleva a cabo a 72°C (temperatura ideal de actividad de la DNA polimerasa) y el tiempo de extensión depende primordialmente del tamaño del fragmento que se va a amplificar. Estos tres pasos representan un ciclo, y en cada ciclo el número de moléculas blanco se duplica, lo que resulta en una amplificación exponencial de los fragmentos de DNA específicos. El tamaño del producto será igual a la suma de la longitud de los primers más la distancia que separa los dos oligonucleótidos en el DNA molde.

Para la preparación de la muestra; Inicialmente, se utilizaron métodos de extracción complejos, con los cuales se garantizaba la calidad y estabilidad del ácido nucleico. En los métodos convencionales para la extracción de DNA se hace una desproteinización con proteinasa K en presencia de SDS, un tratamiento con fenol-cloroformo y por último una concentración del ácido nucleico, precipitándolo con etanol y sal. Para la obtención de RNA se hace inicialmente un tratamiento con una solución concentrada de isotiocianato de guanidina el cual es una sal con una fuerte capacidad de denaturalizar proteínas seguido de la extracción con fenol-cloroformo y la precipitación con etanol y sal. Este método de extracción es bastante eficiente y el ácido nucleico resultante es bastante estable. Sin embargo, es muy dispendioso y cualquier pequeña contaminación con los solventes puede interferir durante la reacción de PCR. Hoy en día existen métodos para la extracción rápida de los ácidos nucleicos que proveen material con la calidad suficiente para hacer estudios de amplificación. Más aún, en algunos protocolos de diagnóstico con la simple solubilización de la muestra clínica es suficiente para realizar la PCR. Es importante resaltar que la limitación más grande para el uso del PCR en el diagnóstico virológico ha sido la presencia de sustancias inhibitoras de la reacción en algunas muestras clínicas como es el caso de materia fecal, semen, moco y orina. Estas muestras, por lo tanto, deben tratarse en forma especial.

Desde la descripción de la técnica original de PCR se han descrito numerosas modificaciones del procedimiento estándar. Algunas de estas modificaciones

han expandido las aplicaciones aumentando su capacidad diagnóstica y su utilidad en el laboratorio clínico. En este capítulo revisaremos brevemente aquellas modificaciones que tienen una aplicación directa en el diagnóstico virológico.

Es importante resaltar que no existen procedimientos de PCR universales, que permitan a través del mismo protocolo la amplificación de todos los virus DNA y RNA. Se pueden utilizar los estuches comerciales o estandarizar condiciones propias para cada virus partiendo en general de experiencias reportadas previamente en la literatura.

PCR con Transcriptasa Reversa (RT-PCR): Su objetivo es la amplificación de secuencias de RNA, lo que permite el diagnóstico de infecciones por este tipo de virus. En este proceso el RNA es inicialmente convertido en DNA complementario (cDNA) mediante la acción de la enzima transcriptasa reversa (RT) y posteriormente se realiza la PCR estándar. La introducción al mercado de la enzima DNA polimerasa Tth (proveniente de *Thermus thermophilus*), la cual tiene actividad de transcriptasa reversa ha simplificado bastante este proceso. Los estuches comerciales para la detección de la infección por el virus de la inmunodeficiencia adquirida (VIH) y el virus de la hepatitis C están basados en la técnica de RT-PCR.

PCR Anidada (nested PCR): Esta técnica permitió aumentar la sensibilidad y especificidad de la prueba estándar ya que se realiza un doble proceso de amplificación. Durante la primera ronda de amplificación se utiliza un juego de iniciadores específicos. El producto de la primera ronda se somete a una segunda ronda de amplificación utilizando otro juego de iniciadores específicos para una secuencia interna amplificada durante la primera ronda de amplificación. La principal desventaja de este protocolo es la alta probabilidad de contaminación durante la transferencia del producto de la primera amplificación a un segundo tubo de reacción. El PCR anidado fue rápidamente implementado para el diagnóstico de la infección por el virus del dengue. En esta aplicación particular durante la primera ronda de amplificación se utilizan iniciadores que reconocen indiscriminadamente secuencias de cualquier serotipo del dengue y durante la segunda ronda de amplificación ya se utilizan iniciadores internos específicos de cada serotipo de dengue, lo cual permite obtener información fundamental desde el punto de vista epidemiológico. Esta prueba también se ha utilizado en el diagnóstico de infecciones por citomegalovirus.

PCR *in situ*: El ácido nucleico es amplificado directamente en la célula. En este protocolo se combina la sensibilidad de la PCR y la capacidad de la hibridación *in situ* de localizar las secuencias blanco. A través de esta técnica se ha podido detectar hasta una copia génica, del virus del papiloma, permi-

tiendo la determinación rápida del serotipo implicado. Existen dos variantes de esta técnica:

PCR indirecto *in situ*: la mezcla de reacción de PCR se adiciona directamente a las células o tejidos previamente fijados para proceder a la reacción de amplificación en el termociclador. La amplificación se detecta por métodos convencionales de hibridación *in situ* utilizando sondas de DNA no radioactivas. En forma alternativa se puede remover la mezcla de reacción de PCR y realizar una electroforesis en gel de agarosa, o un Southern blot, para verificar el tamaño y, en el caso del Southern, la especificidad del producto obtenido.

PCR directo *in situ*: En la mezcla de la reacción uno de los dNTPs se reemplaza por un dNTP marcado, por ejemplo con biotina. Posteriormente, la amplificación se detecta utilizando una sonda marcada con avidina fluorescente. De nuevo la verificación del tamaño y especificidad del producto se puede hacer a través de un gel de agarosa y un Southern, respectivamente.

PCR Cuantitativo: Después de una estandarización eficiente de las condiciones de la amplificación, la concentración del producto de PCR se correlaciona directamente con el número de moléculas blanco que se encontraban inicialmente en la muestra problema. Para poder cuantificar el producto de una amplificación la PCR se debe optimizar para lograr una máxima eficiencia; las muestras deben ser correctamente procesadas para excluir inhibidores y se debe preparar una curva de calibración coamplificando estándares internos que deben ser incluidos en cada ronda de amplificación. El PCR cuantitativo es bastante útil particularmente en aquellas infecciones virales donde la cantidad de virus tiene relevancia clínica, o que permita determinar la eficiencia del tratamiento, como es el caso de las infecciones por el VIH y el virus de la hepatitis C.

PCR Múltiple: Se utilizan múltiples parejas de iniciadores para amplificar simultáneamente varias secuencias de DNA. La temperatura de alineación de los iniciadores, así como la longitud de los segmentos a amplificar, deben ser similares para que no se favorezca la amplificación de una secuencia en particular. Este método se ha utilizado para la identificación de infecciones por adenovirus y herpesvirus en infecciones conjuntivales.

Otras técnicas de amplificación: existen otras técnicas de amplificación que pueden ser separadas en dos clases: amplificación de la secuencia blanco similar a la que se logra durante la PCR o la amplificación de la sonda que se ha unido a la secuencia blanco. En el primer grupo se destacan la replicación sostenida de secuencias (3SR) y la amplificación con desplazamiento de cadena (SDA). El sistema de replicasa Qb y la reacción en cadena de la ligasa (LCR) hacen parte de los protocolos que determinan la presencia de un ácido nucleico

blanco a través de la amplificación de la sonda. De estos protocolos solamente una variación del SDA, la cual se conoce como NASBA es ampliamente utilizado en el diagnóstico viral, particularmente en la detección de la infección por el VIH.

Análisis de Productos Amplificados

Después de la amplificación de la secuencia blanco, la forma más simple y común de detectar el producto es mediante la electroforesis en gel de agarosa seguida de la tinción con bromuro de etidio. Existen otras técnicas que permiten no sólo la visualización de los productos, sino que también aumentan la sensibilidad y especificidad de los procesos de amplificación; una de las más utilizadas en diagnóstico viral es la detección del producto amplificado por medio de sondas de DNA utilizando el principio de hibridación previamente descrito en este capítulo. El proceso de hibridación puede hacerse en Dot blot o en Southern blot. Las sondas a utilizar pueden estar marcadas radioactivamente, en este caso las membranas sobre las cuales se realiza la reacción de hibridación se exponen a películas para rayos X, en tanto que las marcadas enzimáticamente se visualizan por la producción de luz o color. Adicionalmente se ha desarrollado el inmunoensayo enzimático de DNA (DEIA), a través del cual se puede detectar la reacción entre el amplicón y una sonda específica. En esta técnica se utiliza un anticuerpo que reconoce el producto final de hibridación entre el DNA de doble cadena (dsDNA) y la sonda específica. El complejo formado se revela mediante una reacción colorimétrica.

Bibliografía

- Tang YW, Procop GM, Persing DH. Molecular diagnostics of infectious diseases. Clin Chem. 43: 2021-2031. 1997.
- Toro AI, Correa AM, Campuzano G. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la determinación de la carga viral del VIH. Medicina y Laboratorio. 8(11): 627-640. 1998.
- Forghani B, Hagens S. Amplification and detection of viral nucleic acids. In: Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. Lennette EH. et al, Eds. 7th. ed. American public health association. Washington DC. 1995.