

# 5. Técnicas moleculares de diagnóstico virológico: Amplificación de ácidos nucleicos

*Sandra Gallego y Viviana Ré*

## Introducción

Los métodos basados en la detección de genomas virales son comúnmente llamados métodos moleculares.

La moderna tecnología desarrollada para la detección de genomas virales ha recibido un gran impulso en los últimos años. Aunque el progreso en las diferentes ciencias parece ser lento, en el caso de la biología molecular ha sucedido lo contrario. Así, dicha disciplina ha sido afortunada con grandes cambios en un tiempo relativamente corto: a mediados de los años 70 se produjeron grandes descubrimientos como la identificación de enzimas de restricción, el desarrollo de vectores de clonación y la introducción de técnicas nuevas de hibridación de ácidos nucleicos (Southern blot). Un segundo salto tecnológico ocurrió en 1985, con la introducción de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La técnica de PCR, inventada y desarrollada por el químico Kary Mullis en 1983, es sin duda uno de los descubrimientos que más ha revolucionado la biología molecular. Esta técnica es una forma simple y rápida de multiplicar el ADN presente en diferentes muestras biológicas al permitir la obtención de millones de copias de una determinada secuencia genómica. Posteriormente, mediante técnicas suplementarias se puede identificar el fragmento amplificado. Es muy utilizada tanto en los laboratorios de diagnóstico como en los de investigación. Esta tecnología se aplica en campos tan diversos como el de las enfermedades infecciosas, en el estudio de enfermedades genéticas y oncológicas y en medicina legal.

En virología, la técnica de PCR permite identificar el agente infeccioso (diagnóstico etiológico) independientemente de la respuesta serológica del individuo, por lo que es muy útil en los siguientes casos:

- Infecciones con prolongados períodos de ventana inmunológica, en los cuales los anticuerpos aparecen en un estado avanzado de la infección.
- Para establecer la cronicidad de ciertas infecciones (ej: Hepatitis B).
- Diagnóstico de infección viral neonatal, donde el diagnóstico serológico temprano no es posible por la presencia de anticuerpos maternos circulantes.
- Para definir el diagnóstico en los casos de individuos con patrones indeterminados por las metodologías de diagnóstico serológico.
- Cuando se carece de sistemas “in vitro” de aislamiento viral.
- Cuando no se dispone de reactivos para detectar antígenos virales, o bien su sensibilidad es baja.
- Para determinar niveles de replicación viral en el monitoreo de las terapias antivirales.
- Para determinar la variabilidad genética de las cepas infectantes.

## Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR es una técnica que permite la multiplicación (amplificación) de una secuencia específica de ADN a partir de una única copia de dicha molécula, llamada ADN original o

blanco (Fig. 5.1). Para que la reacción se lleve a cabo es necesario contar con tres componentes esenciales en una mezcla de reacción o “master mix”:

- La enzima Taq ADN polimerasa,
- Un par de primers o secuencias iniciadoras
- Los 4 nucleótidos constitutivos del ADN (adenina, guanina, citosina y timina)

La PCR amplifica un único fragmento de ADN copiando la secuencia de nucleótidos muchas veces. Los iniciadores seleccionados son una secuencia de 15 a 30 bases complementarias a ambas extremidades de la región a ser amplificada.

La reacción consiste básicamente en tres etapas que son efectuadas a diferentes temperaturas y por esta razón, es necesario el uso de un equipo especial llamado termociclador.

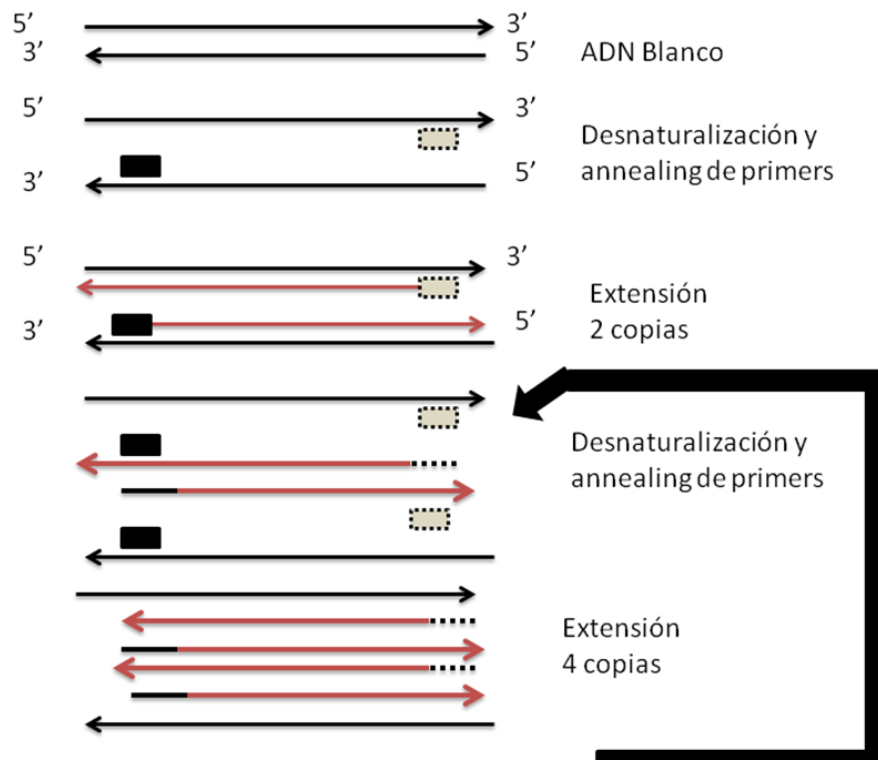
La primera etapa de la reacción, la desnaturalización se realiza a una temperatura de 94°-95°C para posibilitar la separación de la doble cadena de ADN en dos cadenas simples.

Después de un determinado tiempo ( $\approx 1$  minuto) el termociclador cambia la temperatura a un valor que puede variar de 50°C a 65°C, iniciando la segunda etapa de annealing. En este rango de temperatura los dos iniciadores “primers” se unen a las secuencias complementarias del ADN blanco (cada iniciador se une específicamente en la región 3' de cada una de las cadenas simples del ADN). La naturaleza de esta unión es la que confiere la especificidad a la reacción de PCR.

La tercera etapa de polimerización, se inicia por un nuevo cambio de la temperatura a 70-72°C. En este momento, la Taq polimerasa (enzima capaz de sintetizar una cadena de ADN a partir de un molde de ADN) al encontrar al “primer” ligado a una secuencia complementaria de ADN simple cadena, comienza a sintetizar una nueva cadena por la adición sucesiva de los cuatro nucleótidos, “leyendo” la secuencia molde de ADN. Esta reacción de polimerización es interrumpida luego por un cambio de la temperatura, la cual se eleva nuevamente a 94°C. Así se inicia un nuevo ciclo de reacción.

Estos 3 ciclos se repiten 30 a 40 veces y en cada uno de ellos, en condiciones óptimas y con un máximo rendimiento de la reacción, el número de copias (secuencia comprendida entre los dos primers: amplicón) se duplica permitiendo un aumento exponencial de la cantidad de ADN original. Finalmente, en condiciones óptimas de amplificación, a partir de una copia de ADN blanco y después de 20 ciclos de amplificación se llega a un total aproximado de 1.000.000 de copias de amplicones.

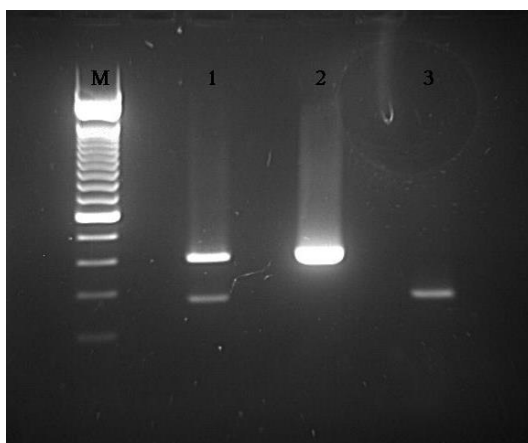
Debido a la gran capacidad de la PCR de multiplicar un fragmento de ADN (alta sensibilidad), se deben tomar precauciones para no contaminar la reacción con amplicones producidos en reacciones anteriores, a fin de evitar resultados falsos positivos. El riesgo de contaminación con amplicones es mayor cuando se trabaja con sistemas de PCR artesanal que cuando se trabaja con sistemas cerrados.



**Fig. 5.1.** Esquema de la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El producto de la amplificación de DNA por PCR puede ser:

- Revelado directamente
- Por visualización en un gel de agarosa o poliacrilamida teñido con bromuro de etidio e iluminado con luz ultravioleta (Figura 5.2)
- Por hibridación con una sonda específica marcada en fase líquida o en fase sólida (dot blot o Southern blot)
- Amplificado nuevamente por una Nested - PCR utilizando un par de primers que hibriden con una secuencia interna del fragmento previamente amplificado en la PCR, y posteriormente revelado.
- Sometido a restricción enzimática y posterior análisis (genotipificación).
- Secuenciado.



**Fig. 5.2.** Corrida electroforética en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio de los productos de amplificación por PCR de la región genómica 5' NC del virus de la Hepatitis C (280 pb) y de la región NS5 del virus de la Hepatitis G (400pb). M: marcador de peso molecular ladder 100pb. Calle 1: PCR de un paciente coinfectado con HCV y HGV; Calle 2: PCR positiva para HGV; Calle 3: PCR positiva para HCV.

## Tipos de PCR

### PCR anidada (Nested PCR)

Es utilizada para aumentar tanto la sensibilidad como la especificidad de la PCR. En la PCR anidada el producto de una amplificación es utilizado como molde para realizar una segunda amplificación con iniciadores o *primers* que se ubican dentro de la primera secuencia amplificada. Este tipo de PCR es muy específica.

### PCR *in situ*

La PCR *in situ* consiste en una reacción de PCR realizada en secciones histológicas o células (fijas en portaobjetos), donde los productos generados pueden visualizarse en el sitio de amplificación. La detección de la amplificación se realiza en este caso mediante hibridación *in situ* con sondas de DNA/RNA.

### PCR multiplex

Se utiliza para amplificar simultáneamente múltiples segmentos de DNA en una misma reacción, mediante el uso de dos o más pares de *primers* en único tubo. En virología se utiliza para detectar en una misma reacción dos o más fragmentos genómicos de diferentes virus partiendo de la misma muestra y en una misma reacción. También se utiliza usualmente para detectar dos o más tipos virales de un mismo virus usando *primers* específicos de tipo en una misma reacción (ej: dengue 1-4).

### RT-PCR (Transcripción inversa y PCR)

En este caso el molde inicial es RNA y se requiere de una transcripción inversa previa a la amplificación, con el fin de convertir el RNA a DNA complementario (DNAc).

## PCR en tiempo real

En la PCR en tiempo real los procesos de amplificación y detección se producen simultáneamente en el mismo vial cerrado. La detección se realiza por fluorescencia, pudiendo medirse durante la amplificación el ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Para esto, los termocicladores incorporan un lector de fluorescencia. Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos.

Los agentes intercalantes son fluorocromos que aumentan la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de doble cadena. El más empleado es SYBR Green I. Este sistema de detección tiene la ventaja de ser más sencillo de optimizar y resulta más económico, pero es poco específico. Es por esto, que es necesario que se ajusten adecuadamente las condiciones de amplificación y la elección de los primers a utilizar debe ser muy cuidadosa.

Las sondas de hibridación específicas, son sondas marcadas con dos fluorocromos, un donador y un receptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas. Las más utilizadas son las sondas de hidrólisis, denominadas también sondas Taqman, las sondas molecular beacons y las sondas FRET. (Mackay et al., 2002)

En todos los sistemas, el incremento de ADN en cada ciclo se corresponde con un aumento de hibridación de las sondas, lo que lleva a un aumento en la misma proporción de fluorescencia emitida. El empleo de sonda confiere especificidad al sistema de detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales, pero su costo es más elevado que el SYBR Green I y la optimización de las condiciones de reacción resulta más difícil.

La PCR en tiempo real ofrece algunas ventajas comparadas a la PCR convencional:

- a) rapidez, ya que no se necesita ningún proceso adicional de detección,
- b) menor posibilidad de contaminación, debido a la utilización de sistemas cerrados,
- c) permiten cuantificar la concentración inicial del ADN de manera más sencilla, precisa y en rango más amplios (5-6 log) que en los procesos convencionales (2-4 log).

## Técnicas moleculares aplicadas a la cuantificación viral

El seguimiento de la evolución de algunas infecciones virales se realiza determinando la carga viral, esto es la variación en el tiempo de las concentraciones de virus (cuantificando los ácidos nucleicos virales) en las muestras biológicas. Hay diferentes técnicas comerciales que permiten determinar la carga viral, por ejemplo para los virus HIV-1, HCV, HBV y CMV.

### Técnicas cuantitativas (carga viral):

#### Métodos de Amplificación de señal

Branched DNA (bDNA o ADN ramificado; Siemens): a diferencia de las demás, no utiliza controles internos para cada muestra sino que se emplean para todas las muestras procesadas a la vez. El ácido nucleico extraído se fija en una microplaca que contiene sondas específicas y, sobre el ARN que se une, se fijan sondas de ADN con 15 ramificaciones, a cada una de las cuales se unen 3 sondas marcadas capaces de emitir luz al añadir un sustrato. Por cada molécula de ARN se unen cerca de 1.800 moléculas emisoras de luz y los datos se interpretan en función de las lecturas de los controles, cuya concentración es conocida.

## **Métodos de Amplificación de ácidos nucleicos**

**RT-PCR** (Amplicor, Roche): mediante una mezcla lítica se aísla el ARN viral presente en el plasma y se precipita. En esta fase se introduce, junto al reactivo de lisis, un número conocido de moléculas de ARN (PC o IQS) que sirven como patrón para la cuantificación. Este PC es una molécula no infecciosa de ARN, transcrita in vitro, con regiones de fijación a los iniciadores idénticas a la de la secuencia diana del virus a detectar (Ej: HIV). Da lugar a un producto idéntico en bases a la secuencia blanco pero cuya región de fijación a las sondas es diferente, lo que permite diferenciar entre los productos del PC y los productos diana del virus. En un primer paso se aísla el ARN viral junto con un número conocido de moléculas de ARN (PC o IQS) que sirven como patrón para la cuantificación. Luego a partir del ARN se obtiene ADNc (ADN complementario). La técnica detecta y amplifica una secuencia diana. Para la amplificación se utiliza la polimerasa rTth que tiene actividad de transcriptasa inversa y ADN-polimerasa. Luego de la amplificación los productos son hibridados con sondas oligonucleotídicas específicas. Los amplicones del virus y del PC se desnaturalizan químicamente a ADN monocatenario mediante una solución de desnaturalización y se pasan a una placa de ELISA con pocillos cubiertos por sondas oligonucleotídicas específicas para las secuencias. Los amplicones del virus y PC se unen en los pocillos mediante hibridación con las sondas marcadas con enzimas. La detección se realiza midiendo la densidad óptica de cada pocillo a 450 nm, la cuál es proporcional a la cantidad de amplicon presente.

**Prueba NASBA** (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification, Nuclisens HIV-1 QT, Biomerieux): se fundamenta en una amplificación basada en la transcripción y una detección basada en un método de electroquimioluminiscencia. Cada muestra se procesa con tres controles o calibradores internos presentes a concentraciones diferentes (100, 10 y 1) que se diferencian entre si y del ARN amplificado del HIV en 20 nucleótidos. La reacción de RT se lleva a cabo sobre la muestra y los calibradores mezclados, dando lugar a ADN de doble cadena; toda la amplificación se realiza a una misma temperatura (isoterma) y uno de los iniciadores contiene una zona promotora necesaria para la actuación de la ARN-polimerasa T7 que sintetiza ARN a partir de ADNc. La detección se basa en la emisión de luz por parte de átomos de rutenio unidos al ARN amplificado, que se cuantifica y extrapola sobre una recta obtenida a partir de la emisión de los calibradores.

## **Técnicas moleculares aplicadas al tamizaje de virus en bancos de sangre**

Con el fin de aumentar la sensibilidad de la detección de infecciones virales en donantes de sangre mediante el acortamiento del periodo de ventana inmunológica, se incorporaron en algunos bancos de sangre las técnicas moleculares (NAT) para complementar los estudios serológicos de rutina.

Las dos técnicas aprobadas para su utilización en Argentina son: Procleix Ultrio Assay (Chiron) y COBAS Ampliscreen (Roche) y sus versiones automatizadas.

### *Procleix Ultrio Assay (Chiron):*

Emplea una tecnología de sondas basada en la amplificación selectiva de ácidos nucleicos para la detección de ARN de HIV-1 y de HCV así como para el ADN de HBV en suero/plasma humano. La detección de los ácidos nucleicos virales se realiza a partir de muestras individuales de plasma. El equipo contiene reactivos que se utilizan para la detección simultánea de los tres virus en un mismo tubo de reacción y reactivos que permiten, en una segunda etapa, realizar un ensayo discriminatorio para identificar el agente viral.

El ensayo comprende tres etapas que tienen lugar en un solo tubo: 1- preparación de la muestra, 2- amplificación selectiva del RNA de HIV-1 y HCV y ADN de HBV por una reacción de amplificación mediante transcripción (TMA) y 3- detección de los productos de amplificación por el ensayo de protección de la hibridación (HPA).

Las muestras de plasma se tratan con detergentes para solubilizar las envolturas virales, desnaturalizar las proteínas y liberar los ácidos nucleicos virales, se utilizan oligonucleótidos de captura que hibridan con los genomas virales y el “híbrido” es capturado por partículas magnéticas que los separan del plasma. La amplificación de los ácidos nucleicos virales se hace por transcripción inversa a un ADN copia y luego por una enzima ARN polimerasa se sintetizan varias copias de ARN a partir del molde de ADN. La detección se hace usando sondas de ácidos nucleicos monocatenarios con marcadores quimioluminiscentes que son complementarios al amplicón. El reactivo de selección distingue entre sondas hibridadas y no hibridadas, inactivando las sondas no hibridadas. En cada tubo de reacción se agrega un control interno que siempre debe resultar positivo, y el amplicón específico del control interno se diferencia de los amplicones de los virus contaminantes porque las sondas que se utilizan para la reacción de hibridación emiten diferentes señales de luz. El ensayo de Procleix Ultrio distingue entre las señales emitidas por el control interno y las señales combinadas HIV-1/HCV/HBV pero no discrimina entre estas tres últimas. Así, las muestras reactivas por este ensayo pueden posteriormente analizarse por el ensayo Procleix discriminatorio.

*COBAS Ampliscreen HIV-1 test, COBAS Ampliscreen HCV test y COBAS Ampliscreen HBV test (Roche).*

Son técnicas de amplificación selectiva de ácidos nucleicos que permiten la detección del RNA de los virus HIV-1 y HCV y del ADN del virus HBV en muestras de plasma humano. Mediante esta técnica se realiza la detección de los genomas virales en pools en este caso de 6 muestras de plasmas en un volumen final de 1ml. Los pools que resultan reactivos deben, en una segunda etapa, abrirse a muestras individuales para la identificación de la muestra positiva integrante del pool. La técnica permite realizar las primeras etapas del procesamiento de la muestra, lisis y la extracción de ácidos nucleicos en forma conjunta para los tres virus, pero las reacciones de amplificación y detección por hibridación con sondas se realizan por separado para cada virus en el COBAS AMPLICOR. Las etapas del procedimiento son: 1- procesamiento de la muestra: se preparan pools de 6 muestras de plasma. Se realiza manualmente la concentración viral por ultracentrifugación a altas revoluciones, la lisis viral y la extracción alcohólica de los ácidos nucleicos. A cada pool se agrega un control interno. Este control interno tiene una zona exclusiva de fijación de la sonda para diferenciarse del amplicon objetivo (ácido nucleico viral). 2- transcripción reversa del ARN objetivo para generar ADN complementario. Desde este punto las reacciones continúan por separado para HIV, HCV o HBV y se realizan en el COBAS AMPLICOR. 3- amplificación mediante PCR del ADN complementario utilizando primers específicos para los diferentes virus. 4- Hibridación de los productos amplificados con sondas de oligonucleótidos específicas para los objetivos. 5- detección de los productos amplificados fijados a las sondas por colorimetría. Cuando un pool resulta positivo deben procesarse las muestras individuales constitutivas por un procedimiento similar al Multiprep (procedimiento para pool) con algunas modificaciones.

## **Bibliografía**

Carballal G, Oubiña J. Virus de hepatitis en: Virología Médica. 3ra Edición. El Ateneo. Buenos Aires, 1998.

Chesters, J.K. (1996) Polymerase chain reaction. Proc Nutr Soc. 55 (1B):599-604. Review.

Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real time PCR in Virology. Nucleic Acids Res 30, 1292-1305. 2002.

Mullis, K.B. y Faloona, F. Specific Synthesis of DNA in vitro via polimerase chain reaction. Meth. Enzymol. 155: 335-350. 1987.

Joseph Sambrook and David W. Russel Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. edición, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 0-87969-576-5. 2001.