

Detección del RNA del virus de la fiebre Aftosa mediante una sonda producida por P. C. R.

Arturo Gil *
Daniel Uribe**

RESUMEN

En el desarrollo de un método de detección del virus de la fiebre aftosa (VFA) en animales portadores asintomáticos, se produjeron sondas complementarias al gen de la proteína de cápside VP1, consistentes en productos de amplificación por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) simétrico y asimétrico de un c-DNA que comprendía esta región.

Las sondas fueron DNA de doble cadena (PCR simétrico) y cadenas sencillas (PCR asimétrico). Este último tipo de sonda, aunque no fue evaluada presentaría ventajas en afinidad y sencillez del proceso de hibridización, no necesitando ser desnaturalizada.

Se compararon dos métodos de marcación de la sonda de doble cadena, uno usando iniciadores específicos, el otro usando iniciadores aleatorios. El segundo método fue más eficiente en la incorporación del nucleótido radioactivo.

Por autorradiografía de las moléculas híbridas inmovilizadas sobre membranas de nylon o nitrocelulosa (dot blot) se logró una sensibilidad de 0.4 ng RNA viral no purificado. La especificidad del sistema fue adecuada cuando las membranas fueron lavadas a 68°C, pero no a 37°C.

SUMMARY

As a step towards the development of a detection system for the foot and mouth disease virus (FMDV) in carrier asymptomatic animals, genomic probes were produced complementary to the gene for the VP1 capsid protein.

The probes were double stranded DNA molecules (symmetric PCR) and single stranded DNA (asymmetric PCR). Both were amplification products derived from VP1 gene c-DNA. The ss - probe would have advantages over the ds - probe such as a higher affinity and an easier hybridization procedure, due to the denaturation step not being necessary.

Two labeling procedures were tried for the ds - probe; the first made use of specific primers, the other used random primers. The latter had a higher incorporation efficiency for the radioactive nucleotide.

By autoradiography of the hybrid molecules immobilized on nylon or nitrocellulose membranes (dot blot), a sensitivity of 0.4 ng of non purified viral RNA was obtained. The specificity for the system was adequate when washes of the membranes were performed at 68°C, but not at 37°C.

INTRODUCCION

A pesar de los esfuerzos por erradicar la fiebre aftosa de los países aún afectados por esta enfermedad, las epidemias siguen presentándose episódicamente, infligiendo cuantiosas pérdidas directas y causando el aislamiento comercial de los productos cárnicos de tales países (1).

Nuevas técnicas biomoleculares están facilitando la detección de patógenos. Entre estas se destacan el PCR y las sondas genómicas. La última podría llegar a constituir un método de detección en el campo, del VFA en animales portadores sanos. Estos constituyen los reservorios de donde surgen las nuevas cepas virales resistentes a la profilaxis vacunal y a la inmunidad natural, originando los brotes epidémicos.

Los métodos diagnósticos actualmente usados son de tipo serológico o por reproducción del virus sobre células BHK (baby hamster kidney cells). Estos métodos además de costosos requieren de laboratorios especializados, a donde las muestras, frecuentemente llegan deterioradas, originando resultados falsos negativos. Se ha planteado la necesidad de métodos más rápidos y sensibles, especialmente para detectar la presencia del virus en animales portadores asintomáticos.

* Instituto Colombiano Agropecuario. Santafé de Bogotá. COLOMBIA.
** Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia.
Apartado Aéreo 29743. Santafé de Bogotá. COLOMBIA.

Recientes avances en la detección del virus incluyen las sondas genómicas y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando oligómeros complementarios a dos secciones del genoma viral, como primers o iniciadores de la reacción (2,3).

Este trabajo tuvo como objetivo el desarrollo y caracterización de una sonda complementaria al gen de la proteína estructural VP1 del virus de la fiebre aftosa A-24 Cruzeiro, mediante PCR simétrico (DNA de doble cadena). La molécula de cadena sencilla fue también sintetizada pero no marcada.

PARTE EXPERIMENTAL

Los materiales de vidrio, plástico o metal que estuvieron en contacto con los ácidos nucleicos fueron lavados con agua tratada con dietil pirocarbonato (DPC) al 0.1 %. Todas las soluciones fueron preparadas con la misma agua y esta y los materiales fueron esterilizados en autoclave (4).

Aislamiento del Virus

El virus A-24 Cruzeiro fue multiplicado en monocapas de células BHK-21 de acuerdo a Estupiñan et al.(5). Las células infectadas se cosecharon cuando se habían desprendido o estaban redondeadas antes del efecto citopático. La lisis celular se hizo por tres congelamientos y descongelamientos sucesivos. Las partículas virales fueron concentradas 100 a 1, con polietilen glicol y centrifugación. El anterior sedimento fue diluido 1 a 2 con buffer TRIS-HCl pH 7.6 y ultracentrifugado sobre un gradiente de cloruro de Cesio de dos densidades; 1.44 g/mg y 1.38g/mg en el mismo buffer, en un rotor de ángulo móvil a 249000 g. durante dos y media horas.

Aislamiento del RNA Viral

De la banda con el virus, estacionada sobre el C1Cs 1.44 se recuperó 1 ml, por punción lateral del tubo, el cual se diluyó a 12 ml con buffer TE (TRIS-HCl 10 mM pH 7.6 EDTA 1 mM) y se ultracentrifugó a 257000 g. durante tres horas. El sedimento, unos 100 μ l se diluyó con buffer para la proteinasa K, con la cual se descapsidó el virus (6). El RNA fue recuperado por extracción con Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (25:2:1) precipitado con etanol y redissuelto en agua adicionada de RNAsina. Este RNA fue valorado por densidad óptica a 260 nm y por electroforesis sobre agarosa al 1% bajo condiciones desnaturalantes.

Síntesis del c-DNA

Unos 7 μ g de ácidos nucleicos, incluyendo el RNA viral fueron calentados a 70°C por 3 minutos, adicionados del

buffer para transcriptasa reversa con unas 50 U de la enzima (Pharmacia) y 1 mMol de cada uno de los desoxi nucleósidos trifosfatos, además de 50 pMol del primer 192 o derecho (GEN-SET, Francia) complementario del extremo 3' del gen VP1 (7). El volumen de reacción se completó a 40 μ l con agua y se incubó por una hora a 42°C.

La segunda cadena se sintetizó, degradando antes el RNA con E. coli RNAsa H, por acción de T4 DNA polimerasa (Manual c-DNA synthesis Plus" de Amersham).

Obtención de Sondas por PCR

El c-DNA fue amplificado por PCR en un buffer de reacción (Tris HCl 20 mM pH 8.5, MgCl₂ 1.5 mM, Triton X-100 0.1%) al que se adicionaron 0.2 mM de cada desoxinucleótido y 0.5 μ M de los iniciadores específicos, 5 μ l del c-DNA y 2 unidades de Taq DNA polimerasa (Stratagene) y se completó con agua a 100 μ l. Para el PCR asimétrico se incluyó del iniciador derecho 0.5 μ M y solo 0.025 del izquierdo. Las mezclas se hicieron reaccionar durante 35 ciclos (8), en un termociclador automático Hybaid. El producto de la PCR fue marcado mediante el kit de random primers BRL. Una variación a este sistema consistió en reemplazar los random primers por primers específicos. Los productos resultantes se recuperaron por precipitación etanólica y se evaluaron por electroforesis en geles.

Iniciadores

Fueron diseñados en base a la secuencia del virus A24 Cruzeiro minimizando su afinidad por segmentos distintos a los de los extremos del gen de la VP1 mediante análisis computarizado. La síntesis se hizo en un sintetizador automático en GEN-SET de París.

Sensibilidad y Especificidad de las Sondas

Se establecieron estas características por "dot blot" sobre membranas para hibridización de Hybond, mediante técnicas estándar (4). La solución de prehibridización fue: blotto 0.05X, SSC 6X y formamida 50%. La sensibilidad se valoró aplicando a la membrana diluciones entre 10⁻² y 10⁻⁵ de los RNA virales extraídos según la técnica expuesta y partiendo de una concentración estimada en 3 μ g de ácidos nucleicos. La especificidad se dedujo observando reacciones entre ácidos nucleicos de microorganismos no relacionados con el VFA y las sondas. A cada membrana se le adicionó solución de sonda a una concentración de 1 millón de cpm/ml.

Lavado de las Membranas

Se hizo de acuerdo a Maniatis et al, 1989, (4) a 37°C por una hora en una solución con 0.1X SSC y 0.5% SDS. La temperatura de los lavados fue aumentada hasta 68°C para eliminar la radioactividad inespecíficamente retenida por ácidos nucléicos no relacionados con el VFA (Fig. 4.)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento del RNA Viral

La relación entre las absorbancias a 260 y 280 nm fue entre 1.95 y 1.65. Las electroforesis sobre geles de agarosa bajo condiciones normales o desnaturizantes resultaron en una dispersión de los ácidos nucléicos a lo largo del recorrido, indicando que la preparación no era homogénea (Fig. 1.). En áreas inferiores de los recorridos fueron visibles conglomerados de ácidos nucléicos posiblemente de RNA viral intacto, ya que su tamaño molecular coincidió con el esperado. El RNA pudo sufrir degradación parcial, pero más probablemente la dispersión representa ácidos nucléicos de origen celular, ya que la banda entre las soluciones de CsCl después de la ultracentrifugación, parecía haber sido tocada por material que yacía mayormente sobre la capa superior del CsCl. Se recomienda usar una capa mayor al centímetro de espesor usado en este trabajo.

Síntesis del c-DNA

Usando como plantilla al RNA heterólogo arriba descrito, se sintetizó un c-DNA comprendido entre los iniciadores que flaqueaban al gen VP1. El precipitado etanólico del c-DNA no fue visible. Tampoco fue visualizado por bromuro de etidio sobre geles o papel vinílico, ni por espectrofotometría. A pesar de la reducida cantidad de c-DNA producido, este fue usado como plantilla para la PCR. El producto de PCR de esta reacción fue recobrado por precipitación con etanol y su peso molecular calculado por comparación con patrones corridos electroforeticamente junto con este en geles de poliacrilamida al 8%. El peso fue equivalente a 550 pb. La banda correspondiente fue nítida para el PCR simétrico. (Fig. 2.). El producto del PCR asimétrico se reveló como una banda más ancha y algo más dispersa, pero en promedio correspondiente a una molécula de la misma longitud, a pesar de ser de cadena sencilla (información no mostrada). La dispersión de la sonda monocatenaria puede deberse a que es una mezcla de cadenas dobles y sencillas en la que predominan las últimas.

Marcadores

La eficiencia de incorporación radioactiva fue baja, entre 2 y 10% cuando se usaron los primers específicos. Cuando se

usaron iniciadores hexaméricos de secuencias aleatorias (Gibco BRL), la incorporación se aumentó al 33%. Posiblemente la baja incorporación lograda mediante el uso de primers específicos se debió a temperaturas de unión, entre plantilla e iniciadores desfavorables.

En cualquiera de los casos la actividad específica alcanzada para la sonda radioactiva osciló entre 1.68×10^9 cpm/μg y 9.71×10^6 cpm/μg.

Sensibilidad

La sensibilidad calculada mediante la reacción de la sonda contra diluciones progresivas de RNA viral es aparente, ya que en el RNA no fue homogéneo (Fig. 1.). La mayor dilución a la que se detectó reacción de hibridización correspondió a 0.4 ng de ácido nucléico. La densidad de las manchas fueron proporcionales a la cantidad de RNA viral presente en las diluciones aplicadas a las membranas. (Fig. 3 y 4).

DISCUSIÓN

Las moléculas contaminantes del RNA no interfirieron con la síntesis del c-DNA al usarse iniciadores específicos; el derecho complementario al extremo 3' del gen de la VP1 y el izquierdo de secuencia idéntica al extremo 5' del mismo gen, pero de orientación antiparalela.

Pudo ocurrir que la baja concentración de moléculas de RNA viral, causara la reducida síntesis del c-DNA, imposible de visualizar. No obstante, y a pesar de los anteriores dos inconvenientes, la amplificación por PCR usando primers específicos reveló la síntesis de un c-DNA de la longitud esperada. En base a estos resultados, la metodología empleada tendría ventajas sobre los métodos corrientes de producción de sonda, como la clonación, ya que esta no se requeriría, ante la abundante generación de moléculas por PCR. La elevada cantidad de c-DNA, el cual además de contener extremos de restricción clonables, también se hace innecesaria.

Otra aparente ventaja de la metodología aquí usada sería la de producir sondas de una sola cadena, lo cual aumentaría afinidad por el RNA y economiza los nucleótidos fríos y el marcado de la cadena no hibridizable de un DNA bicatenario.

El futuro método de marcación radioactiva debería consistir en incluir un nucleótido radioactivo entre los reactivos para la PCR, de este modo se evitaría la fase adicional de marcación por primers aleatorio y serviría para marcar sondas mono y bicatenarias superando la restricción de la marcación de la sonda monocatenaria que impidió su evaluación en este trabajo.

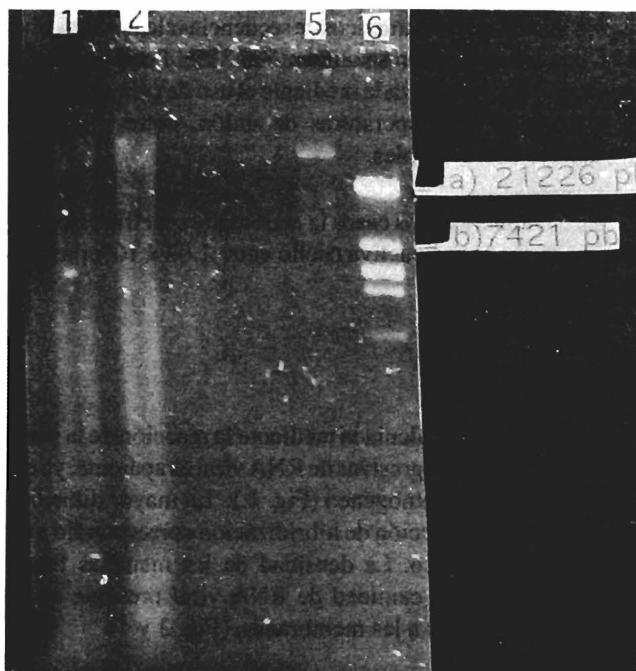


Figura N° 1.

Carril 1 y 2 dos extracciones diferentes del RNA del V.F.A "A 24 Cruzeiro", desnaturizados con formaldehido. Carril 6, bacteriófago lamda digerido con la enzima de restricción Eco R1. Carril 5, el mismo patrón en condiciones denaturantes. A, posibles conglomerados de RNA viral.

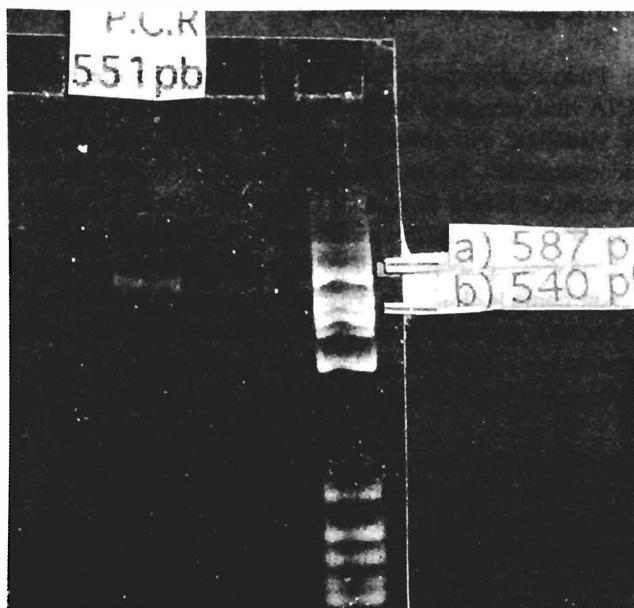


Figura N° 2.

Producto de amplificación por P.C.R. del gen de la proteína estructural VP1 del "V.F.A. A 24 Cruzeiro" (SONDA), correspondiente a un peso molecular aproximado de 551 pb. E1 gel es de poliacrilamida al 8% en T.B.E. 0.5 x.

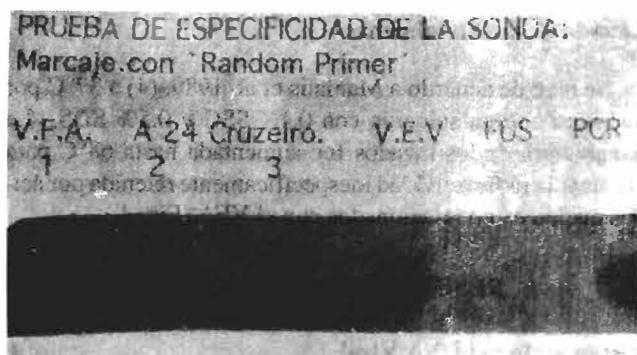


Figura N° 3.

Autorradiografía de membranas Hybond portadoras de diluciones seriadas de RNA viral noprificado (concentración inicial 3.5 g) e hibridizado con sonda radiactiva homologa. Fus: Ácidos nucléicos de *Fusarium oxiosporum*. PCR: producto de amplificación del c-DNA correspondiente al RNA viral.

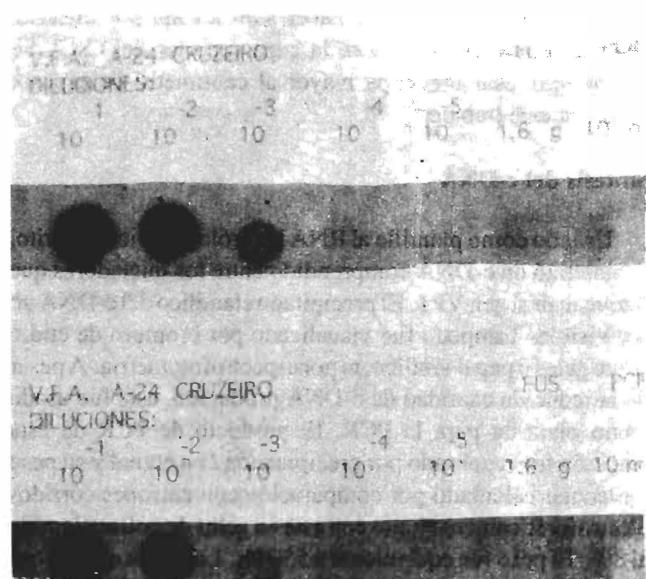


Figura N° 4.

Autorradiografías de membranas Hybond portadoras de diluciones seriadas de RNA del VFA, del virus de la Estomatitis Vesicular (VEV), DNA de *Fusarium oxiosporum*(FUS) y producto PCR correspondiente al VFA. Los ácidos nucléicos fueron hibridizados con sonda radioactiva dirigida al gene VP1 del VFA.

Membrana A lavado a 37°C. Membrana B lavada a 68°C.

BIBLIOGRAFIA

1. R. Casas R. y O. Lascoaga,, *Br. Vet. J.* 134, 16, (1.987).
2. R.G. McFarlane, T.W. Molitor y V.N. Vakharia, *J. of Virological Methods.* 27, 175. (1990)
3. E. Martínez , Rodriguez A., Dopazo J., Dátila M., Saiz J.C. y Sobrino F. *Virology*, 181, 363. (1992)
4. T. Maniatis, E.F. Fritsch y A. Sambrook, *Molecular cloning a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory. 1989. Second Edition. New York.
5. J. Estupiñan, C.A. Rocha et al. *Manual de técnicas del programa de enfermedades vesiculares.* Instituto Colombiano Agropecuario. Documento de trabajo N° 20. Bogotá. 1.978
6. M.J. Grubman, B. Baxt y H.L. Bachrach. *Virology*, 97, 22. (1979)
7. Dopaso J., F. Sobrino, E. Palma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ., 85, 6811, (1.988)
8. M.A. Innis y D.H. Gelford, *Optimization of PCR's, PCR protocols. A guide to methods and applications.* Academic Press. 1990. London.