

RT-PCR EN TIEMPO REAL PARA DETECCIÓN DE FIEBRE AMARILLA

Agosti Francina¹ y Baridón M. de los Ángeles²

1 Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. Actualmente Laboratorio de Electrofisiología, Instituto Multidisciplinario de Biología Celular. Calle 526 y Camino Belgrano, CP 1900, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

2 Laboratorio de Virología, Hospital Interzonal General Agudos Prof. Dr. R. Rossi, La Plata. Calle 37 e/116 y 117 N° 183, CP 1900, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

agfrancina@gmail.com

PALABRAS CLAVE

Fiebre amarilla

RT-PCR

TaqMan

SYBR Green

RESUMEN: La Fiebre Amarilla es una infección transmitida por mosquitos caracterizada por falla hepática, renal, miocárdica y hemorragias generalizadas con una alta tasa de letalidad. Es producida por el virus de la Fiebre Amarilla, perteneciente a la familia *Flaviviridae*. Esta enfermedad es común en Sudamérica y en África subsahariana. El diagnóstico a tiempo es muy importante para evitar que el desarrollo de la enfermedad lleve a los cuadros severos e incluso a la muerte. Hasta el momento existen dos tipos de diagnóstico: el indirecto por serología y el directo por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En los últimos años se ha ampliado la utilización del diagnóstico por PCR debido a su facilidad, rapidez y especificidad. En este trabajo de tesis proponemos poner a punto una RT-PCR en tiempo real para la detección rápida de Fiebre Amarilla probando dos tipos de reacción, una con sonda inespecífica, SYBR Green, y una con sonda específica, TaqMan.

KEYWORDS

Yellow fever

RT-PCR

TaqMan

SYBR Green

REAL TIME RT-PCR FOR DETECTION OF YELLOW FEVER

ABSTRACT: Yellow Fever is a transmitted- mosquito infection characterized by liver, kidney and heart failure, and generalized hemorrhages with high case fatality rate. Yellow Fever is produced by a virus from *Flaviviridae* family. The disease is usual in South America and Sub-Saharan Africa. The diagnostic on time is important to avoid the development of the disease that can lead to severe damage or even dead. Until this moment there are two types of diagnostic: the indirectly by serology, and the directly by polymerase chain reaction (PCR). On the last years the utilization of the PCR has been extended because their feasibility, rapidity and specificity. On this thesis we propose to optimize a real time RT-PCR for rapid detection of Yellow Fever using two types of reaction: unspecific probe reaction, SYBR Green, and specific probe reaction, TaqMan.

INTRODUCCION

Epidemiología y enfermedad

Los Flavivirus han tenido un importante impacto en humanos a través de los últimos siglos. Siendo especialmente importante en América, donde han surgido dramáticos brotes de Fiebre Amarilla transmitida por mosquitos en el siglo XVIII y XIX.

La familia *Flaviviridae* actualmente está compuesta por tres géneros: los *Flavivirus*, que incluye al menos 73 virus distintos, incluyendo muchos patógenos humanos, que son transmitidos por artrópodos hematófagos. Los miembros del género *Pestivirus* causan enfermedades de importancia económica en ganado, cerdos y ovejas. Y el género *Hepacivirus* contiene un único miembro, el virus de la hepatitis C. Los pestivirus y el virus de la hepatitis C no se transmiten por vectores artrópodos.

La Fiebre Amarilla fue reconocida por primera vez en 1648 en el Yucatán. El progreso de la enfermedad tiene tres estadios [1]: (1) un estado inicial marcado por fiebre alta acompañado por dolor muscular, dolor de cabeza y vómito severo; (2) un estado quiescente en el cual la fiebre se disipa y el paciente parece estar en remisión; y (3) un estado final caracterizado por

la reaparición de los síntomas originales pero en una forma más severa, lo que resulta en falla de varios órganos llevando a una mortalidad del 20 al 50%. Muchas víctimas sufren de hepatitis aguda, lo que provoca un tinte amarillo en la piel, de aquí el nombre de la enfermedad.

Cualquier persona puede contraer la Fiebre Amarilla, pero las personas de mayor edad presentan un riesgo mayor de infección severa. Si una persona es picada por un mosquito infectado, los síntomas generalmente se desarrollan entre 3 y 6 días más tarde [2] debido al período de incubación de la enfermedad.

No existe tratamiento específico para esta enfermedad, sólo medidas generales y tratamiento sintomático en unidades de cuidado intensivo cuando la severidad de la enfermedad así lo requiere.

En la década de 1930 se desarrolló una vacuna segura y efectiva contra el virus de la fiebre amarilla (cepa 17D). Es una vacuna de virus vivo atenuado utilizada para la inmunización activa contra la fiebre amarilla de adultos y niños a partir de los 6 meses de edad. Es producida a partir del cultivo de una cepa atenuada del virus de fiebre amarilla. A pesar de ser una de las mejores vacunas virales conocidas, la Fiebre Amarilla continúa causando muerte en poblaciones no vacunadas de Sudamérica y África.

Aspectos moleculares del virus

Los *Flavivirus*, de los cuales el virus de Fiebre Amarilla es el prototipo, poseen un ácido ribonucleico de cadena sencilla de polaridad positiva de aproximadamente 11 kb que codifica para diez proteínas, tres estructurales: la proteína de la nucleocápside (C), la proteína asociada a la membrana (prM) y la proteína de la envoltura (E) y siete proteínas no estructurales (NS, *non structural*): NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 [3]. Una vez que los virus se unen a los receptores de membrana en la célula hospedadora, ocurre un proceso endocítico. Durante este proceso, la acidificación del medio provoca un cambio conformacional de la proteína E, que pasa de ser un dímero a ser un trímero. Esto facilita la fusión de la envoltura viral con la membrana endosómica y se libera así la nucleocápside hacia el citoplasma. Una vez allí, el virus aprovecha la maquinaria de traducción de la célula generando una poliproteína de aproximadamente 3.400 aminoácidos. Esta poliproteína es clivada por proteasas celulares y virales. La traducción de la poliproteína ocurre en el retículo endoplásmico rugoso, lo cual facilita la localización de las proteínas virales dentro y alrededor del retículo para su posterior ensamblaje en viriones maduros. Inicialmente se forman unas partículas virales inmaduras no infecciosas a nivel del retículo endoplásmico, formadas por las proteínas E y prM, además de la nucleocápside y lípidos de membrana. La ruptura proteolítica de prM ocurre en el aparato de Golgi, madurando de esta forma la partícula viral y haciéndola infecciosa. Este virus completo es liberado de la célula por exocitosis para así infectar nuevas células. Algunas proteínas no estructurales forman el complejo de replicasa viral. Este complejo se une a la región 3' del ARN genómico y copia a partir de la cadena de polaridad positiva, generando cadenas de polaridad negativa, que a su vez generarán copias de ARN de polaridad positiva que tienen tres destinos, pueden servir nuevamente como plantillas transcripcionales, o como plantillas traducionales o ensamblarse dentro de la nucleocápside y servir como ARN genómico de nuevos viriones. Tras la inoculación de cualquier *Flavivirus* por un insecto vector, la primera ronda de replicación viral ocurre a nivel de la piel, en las células dendríticas de *Langerhans*, las cuales una vez activadas por los antígenos virales, migran hacia el nódulo linfático, para infectar otras células, activar linfocitos T e inducir la producción de citoquinas y quimioquinas. El virus realiza una segunda ronda de replicación en el tejido linfoide y es llevado hasta la circulación sanguínea, llegando a órganos como el hígado, los riñones, el bazo y aquellos virus neurotrópicos alcanzan el encéfalo. La entrada al sistema nervioso central se da por tres mecanismos principales. El primero es el transporte pasivo a través del endotelio, el segundo es la replicación en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica y el tercero es la utilización de células inflamatorias como vehículos.

Diagnóstico del virus

Diagnóstico clínico: Definición recomendada para vigilancia y de acuerdo a los criterios de la Organización Panamericana de la Salud, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud (OPS): "*Se considera sospechosa de Fiebre Amarilla a aquella enfermedad de comienzo brusco seguido de ictericia luego de 2 semanas de iniciados los primeros síntomas más uno de los siguientes criterios: a) sangrado nasal, encías, tracto gastrointestinal o piel. b) muerte en 3 semanas luego de la instalación de la*

enfermedad."

Estos criterios requieren el antecedente de exposición en zona de riesgo.

Diagnóstico de laboratorio: Existen diagnósticos directos e indirectos.

Indirectos: Serología. El diagnóstico se hace mediante la identificación de anticuerpos específicos para Fiebre Amarilla, IgM e IgG. Se han desarrollado diferentes técnicas de ELISA de captura. La IgM aparece después de la primera semana de iniciado los síntomas y su presencia constituye diagnóstico definitivo de la enfermedad. El diagnóstico mediante IgG requiere del aumento de 4 veces los títulos en dos muestras de sangre consecutivas con 15 días transcurridos entre ambas tomas de muestra. Esto es especialmente importante para las personas que viven en zonas endémicas de fiebre amarilla que pueden tener presencia de anticuerpos IgG por infecciones previas asintomáticas y por lo tanto no significar diagnóstico frente a los síntomas actuales. Otros métodos de diagnóstico serológicos incluyen fijación de complemento, inhibición de la hemoaglutinación y anticuerpos neutralizantes. Estas pruebas se basan en la conversión serológica, por lo tanto, se necesitan dos muestras de suero, de fase aguda y de convalecencia, para la conclusión del diagnóstico.

Directos: Aislamiento viral. El virus de fiebre amarilla puede ser cultivado en líneas celulares específicas o en cerebro de ratón lactante. Puede ser aislado desde la sangre durante la primera semana de la enfermedad después de la cual disminuye considerablemente la viremia, en coincidencia con la aparición de IgM específica.

Reacción en cadena de la polimerasa. Este método de diagnóstico amplifica el genoma viral en sangre y tejidos. Su máximo rendimiento en sangre es durante la primera semana de síntomas, coincidente con una mayor viremia. Es mucho más rápido que el inmunológico. La mayoría de estos ensayos de amplificación utilizan la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) realizando la detección por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio o hibridación con sondas moleculares. Últimamente, se ha descrito una modificación a la RT-PCR estándar, utilizando para la detección sondas marcadas con fluorescencia (TaqMan). Y, como resultado, se han desarrollado varios ensayos para detectar flavivirus utilizando esta técnica [4].

La técnica de PCR en tiempo real ofrece una gran cantidad de aplicaciones al ser capaz de cuantificar de manera absoluta o relativa moléculas molde de ADN o ARN. De este modo, la PCR cuantitativa se usa para determinar la carga vírica, el título de gérmenes y contaminantes en la comida, sangre u otro tipo de muestras, la expresión génica en distintos tejidos, tratamientos o estadios del desarrollo, la discriminación alélica, y la delección o el grado de amplificación de los genes, entre otras aplicaciones.

Para llevar a cabo estas aplicaciones en tiempo real se necesita un termociclador con capacidad para detectar y medir la fluorescencia. La exactitud y la precisión de los aparatos de RT-PCR se ven afectadas, en gran medida, por la razón señal:ruido, la cual depende del método de detección (fluoróforo utilizado que puede ser específico o inespecífico) y de la calidad del sistema óptico [5]. Otro parámetro a tener en cuenta es la homogeneidad de la temperatura dentro del instrumento, ya que la menor desviación de la temperatura llevaría a una cuantificación errónea.

Existen distintos tipos de fluoróforos [5]:

- Inespecíficos (agentes intercalantes): Son fluoróforos que

umentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de doble hélice. El más empleado en PCR a tiempo real es el *SYBR Green I*. El incremento de ADN en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. Este sistema de detección tiene la ventaja de que la optimización de las condiciones de la reacción es muy fácil y además, es más barato que las sondas específicas. El principal inconveniente de los agentes intercalantes es su baja especificidad, debido a que se unen de manera indistinta a productos generados inespecíficamente o a dímeros de cebadores, muy frecuentes en la PCR.

- **Específicos:** Son sondas marcadas con dos tipos de fluoróforos, un donador y un aceptor. 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 (así las llamaremos a lo largo de este trabajo de tesina), las sondas *molecular beacons* y las sondas FRET.

1 . **Sondas TaqMan.** Son oligonucleótidos marcados con un fluoróforo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas. Además, el espectro de emisión de la primera se ha de solapar con el espectro de absorción de la segunda. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación de ADN diana, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la ADN polimerasa, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluoróforo donador. Como donador y aceptor están, ahora, espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector del equipo.

2 . **Molecular beacons.** Son sondas parecidas a las anteriores. Tienen una molécula donadora en el extremo 5' y una aceptora en el extremo 3' pero, además, presentan una estructura secundaria en forma de asa, en la que reside la secuencia de unión específica con el ADN diana. Los extremos permanecen plegados cuando la sonda no está hibridada, lo que conlleva que donador y aceptor estén muy cerca uno de otro. En esta conformación la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor y no es captada por el lector del equipo. Sin embargo, al hibridar con el ADN diana la sonda se abre, alejándose donador y aceptor, pudiendo ser detectada la fluorescencia emitida por el primero.

3 . **Sondas FRET.** El sistema se compone de dos sondas que se unen a secuencias adyacentes del ADN diana. Una de las sondas lleva un donador en el extremo 5' y la otra un aceptor en el extremo 3'. Cuando las sondas están hibridadas, los dos fluoróforos están próximos. Al ser excitado, el donador transfiere su energía al aceptor que, a su vez, emite la fluorescencia que detecta el lector del equipo.

En todos estos sistemas, el incremento de ADN en cada ciclo se corresponde con un aumento de hibridación de las sondas, lo que conlleva un aumento en la misma proporción de fluorescencia emitida. El empleo de sondas garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales, pero su coste es más elevado que el *SYBR Green* y la optimización de las condiciones de la reacción resulta

más difícil.

Debido a la elevada sensibilidad de la técnica, uno de los puntos más importantes a la hora de realizar una PCR en tiempo real, es la calidad del material de partida. Por ello, la extracción de los ácidos nucleicos de la muestra toma un papel crítico y fundamental. Aunque en los últimos años se han hecho grandes progresos en la simplificación de la extracción y purificación de los ácidos nucleicos bacterianos y virales de muestras clínicas hay que llegar a un equilibrio entre los complicados y tediosos pasos de concentración de la muestra (precipitación con etanol, captura de ácidos nucleicos, centrifugación) y la sensibilidad del ensayo.

En este trabajo detectamos el virus de la Fiebre Amarilla, perteneciente a la familia *Flaviviridae* a partir de una cepa vacunal, a través de una RT-PCR en tiempo real cualitativa utilizando el método de TaqMan.

Para la puesta a punto de la reacción comenzamos ensayando condiciones utilizadas para la detección de dengue (perteneciente, al igual que la Fiebre Amarilla, al género de los flavivirus) en el laboratorio de Virología donde se llevó a cabo la tesina. El amplicón utilizado fue el mismo que el utilizado para dengue, debido a que es la región codificante más conservada en el genoma de los flavivirus. Este pertenece a la región del genoma que codifica para el dominio de la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), localizado del lado carboxilo-terminal de la proteína no estructural 5 (NS5).

METODOLOGÍA

Cepa Control

Utilizamos la Vacuna contra la Fiebre Amarilla (Bio-Manguinhos). Perteneciente a la Cepa 17D, subcepa 17DD, producida en huevos embrionados de gallinas libres de agentes patogénicos (SPF), de acuerdo con las normas establecidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Esta vacuna es un producto liofilizado y se debe reconstituir solamente con el diluyente estéril suministrado específicamente para esta finalidad. Luego de la reconstitución, contiene al menos 1.000 DL50 por cada dosis de 0,5 ml.

Cebadores y sonda

El dominio RdRp en el extremo carboxilo-terminal de NS5 es la región más conservada en el genoma de los flavivirus. Se utilizan los cebadores consenso para la familia de los flavivirus que se localizan en esta región, y también lo hace la sonda específica del virus. Estos datos fueron tomados de trabajos publicados previamente [6, 7]. Cuando la sonda fue diseñada, se tuvieron en cuenta los *mismatch* (apareamiento incorrecto) con el alineamiento de distintas cepas del virus.

mFU1 (cebador *forward*): TACAACATGATGGGAAAGCGAGAGAAAAA

CFD2 (cebador *reverse*): GTGTCCCAGCCGCGGTGTCATCAGC

Sonda: F-TCAGAGACCTGGCTGCAATGGATGGT-BHQ1

Los cebadores y la sonda son de Operon. Se solicitaron los cebadores desalados, y la sonda purificada por HPLC.

La secuencia del amplicón que se obtiene, perteneciente a la región carboxilo terminal de la RpRd es:

8993

TACAACATGATGGGGAAAAGAGAGAAGAA GCTGTCAGAGTTTGGGAAAGCAA
GGGAAGCCGTGCCATATGTTATATGTGGCTGGGAGCGCGTATCTTGAGTTTGA
GGCCTGGGATTCCTGAATGAGGACCATTGGGCTCCAGGAAAACCTCAGGAG
GAGGAGTGAAGGCATTGGCTTACAATACCTAGGATATGTGA TCAGAGACCTG
GCTGCAATGGATGGTGGTGGATTCTACG CGGATGACACCGCTGGATGGGACAC
9258

(en verde: sitios de unión de los cebadores; en rojo: sitio de hibridación de la sonda específica)

La secuencia genómica del virus de la Fiebre Amarilla fue extraída del Gen Bank. Y las características del amplicón se determinaron con el programa Primer Premier, colocando en este, la secuencia genómica del virus y los cebadores a utilizar. Las temperaturas de hibridación y *melting* (término utilizado para denominar la temperatura de fusión de las hebras de ADN) se determinaron por medio de una PCR virtual (Tabla 1). Los ΔG de las distintas estructuras como dímeros, *hairpin* (término utilizado para definir estructuras de ADN en forma de horquilla), etc, fueron determinados (Tabla 2).

Tabla 1. Resultados virtuales de la PCR

	longitud	Tm (°C)	% GC	ΔG (Kcal/mol)	Ta óptima
Forward	29	69,5	37,9	-53,5	----
Reverse	26	77,7	69,2	-55,9	----
Producto	266	89,3	51,5	----	58,3

Tabla 2. Resultados virtuales de la PCR

	hairpin	dímeros	falso priming	dímeros cruzados
forward	no	$\Delta G = -5,4$ Kcal/mol	$\Delta G = -18,3$ Kcal/mol	$\Delta G = -6,2$ Kcal/mol
reverse	no	$\Delta G = -16,5$ Kcal/mol	$\Delta G = -19,3$ Kcal/mol	

Para la realización de las primeras pruebas, dados los datos de PCR virtual, utilizamos los parámetros de ciclado y condiciones de reacción similares a las utilizadas para la amplificación de otros flavivirus en el Laboratorio de Virología donde se llevó a cabo la tesina.

Mezcla de reacción

Utilizamos una mezcla de reacción (Master Mix) de la marca Clontech en un paso. En la pre-mix se coloca una transcriptasa reversa para generar el ADNc (ADN complementario) a partir del ARN viral, una Taq polimerasa para realizar las amplificaciones, los cebadores, la sonda y agua en cantidad necesaria para llegar al volumen adecuado.

Extracción del ARN por columna

Ambos kits de extracción utilizados (Invitrogen, de Life Technologies, y NucleoSpin, de Macherey-Nagel) funcionan con los mismos principios. Utilizamos columnas de adsorción en las cuales se coloca la muestra y

soluciones de lavado. La muestra se coloca en un buffer de lisis con un carrier (tRNA que permite la coprecipitación con el ARN de la muestra) para aumentar la eficiencia de la recuperación de los ARN viral de baja abundancia. En un medio con agregado de etanol se crean las condiciones apropiadas para la unión de los ácidos nucleicos a la matriz de sílica de la columna. Los potenciales contaminantes e inhibidores son removidos en sucesivos pasos de lavado, con soluciones que lo mantienen adsorbido por medio de la disminución de la constante dieléctrica. El ácido nucleico luego es eluido con agua libre de RNasas, y está listo para la amplificación posterior.

Protocolo reducido:

- 1) muestra + buffer de lisis. Incubación a alta temperatura (60-70 °C)
- 2) agregado de etanol
- 3) transferencia de la solución a la columna. Centrifugación. Descarte del sobrenadante.
- 4) agregado de la primera solución de lavado. Centrifugación. Descarte del sobrenadante.
- 5) agregado de la segunda solución de lavado. Centrifugación. Descarte del sobrenadante.
- 6) elución del ARN viral adsorbido a la columna con agua libre de RNasas. Centrifugación.

Extracción del ARN viral por la técnica de desalting

Probamos una segunda técnica de extracción del ARN viral para comparar la eficiencia. Decidimos utilizar este proceso de *desalting* de la marca Epicentre Biotechnologies para evitar la utilización de fenol/cloroformo, que son compuestos tóxicos, por lo que es importante encontrar una variante para evitar su utilización.

Este es un proceso de *desalting* rápido que remueve macromoléculas contaminantes, evitando los solventes orgánicos tóxicos previamente mencionados.

Consiste en el agregado de proteinasa K a la muestra con una incubación a 65 °C para la destrucción de las proteínas.

Continúa con la precipitación de los ácidos nucleicos, para lo cual se agrega el agente precipitante, seguido de una centrifugación. Al sobrenadante se le adiciona isopropanol y se vuelve a centrifugar. Se elimina el isopropanol, se lava con etanol. Nuevamente se centrifuga y se descarta el etanol por inversión del tubo y se terminan de descartar los restos de líquido con una pipeta.

El precipitado se resuspende en agua libre de RNasas y la muestra queda lista para realizar la RT-PCR en tiempo real.

RT-PCR cualitativa. Método TaqMan

Utilizamos como muestra para el estudio la cepa control descrita previamente.

La extracción de ARN a partir de la vacuna reconstituida se realizó utilizando kits comerciales para ARN viral que contienen columnas de adsorción, de Invitrogen y NucleoSpin, siguiendo las especificaciones del fabricante.

Los cebadores que se utilizaron, mFU1 y CFD2 generan un amplicón de 266 bases de largo.

Generalmente, la concentración de cebadores utilizada para las PCR es de

alrededor de los 2-5 μM final en el tubo de reacción, en tiempo real se utiliza 10 veces menos. Pero en las RT para el cebado previo a la PCR se utiliza aproximadamente 10 veces más que en la PCR directa. Entonces se decide inicialmente probar 4 μM debido a que en el Laboratorio de Virología esta concentración funciona adecuadamente para el diagnóstico de dengue.

En este trabajo, la temperatura de hibridación inicial a utilizar es de 53°C (temperatura de hibridación utilizada para la detección de dengue con el mismo amplicón en el Laboratorio de Virología); el tiempo de la RT (tiempo necesario para generar el ADNc a partir del RNA viral) es de 20 minutos y a una temperatura de 48 °C, procede un tiempo de 3 minutos a 95 °C para destruir la transcriptasa reversa por desnaturalización y de esta forma evitar que consuma sustratos que utilizará la Taq polimerasa, luego de su activación, en los siguientes ciclos. Los 42 ciclos posteriores consisten en los siguientes tiempos y temperaturas:

- 15 min de activación de la Taq DNA polimerasa.
 - 15 seg a 95 °C (desnaturalización de las doble hebras)
 - 30 seg a 53 °C (hibridación de los cebadores a su molde)
 - 20 seg a 60 °C (extensión del ADN)
- } por 42 ciclos

Técnica de SYBR Green

La mezcla de reacción utilizada es similar a la de TaqMan, pero esta no contiene sonda específica, debido a que el fluoróforo es inespecífico (SYBR Green, Figura 1) y está incluido en la Master Mix proveída en el kit comercial de la marca Clontech.

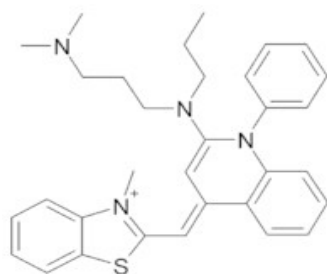


Figura 1. Estructura química del SYBR Green

Mezcla de reacción

Utilizamos una Master Mix Qtaq one step qRT- PCR kit de la firma Clontech. La misma permite hacer en un solo paso la RT y la PCR (one-step PCR). Contiene una RT (transcriptasa reversa) activa (MMLV) y mezcla de DNA Taq Polimeras inactivas por medio de anticuerpos. Y un buffer de RT-PCR, con sales y dNTPs. El magnesio está a una concentración de 3 mM. A la premix para la técnica de TaqMan, se le debe adicionar la sonda marcada con fluorescencia. Mientras que para la técnica de SYBR Green, el fluoróforo es inespecífico y está incluido en la Master Mix que provee el kit.

RESULTADOS

Determinación de la dilución de muestra a utilizar

En un primer ensayo evaluamos la concentración a la que será utilizada la

muestra para las próximas pruebas.

Así, probamos la concentración obtenida en la extracción del ARN viral y diluciones seriadas preparadas con agua libre de RNasas (diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} de la muestra obtenida). El C_T para la reacción sin dilución fue de 21, mientras que para la dilución 10^{-1} se obtuvo un $C_T = 24$, y las siguientes diluciones presentan un C_T mayor. Decidimos utilizar en las pruebas posteriores la dilución 10^{-1} a pesar de que la muestra sin diluir tenga un C_T menor porque no hay demasiada importancia en la diferencia de un ciclo 21 y 24, y utilizando la dilución 10^{-1} se va a aprovechar más la muestra (se tendrá más volumen disponible para realizar las pruebas). Además, como no conocemos la matriz de la vacuna, al diluirla se disminuye la probabilidad de que ocurra inhibición de reacción por algún componente de la matriz.

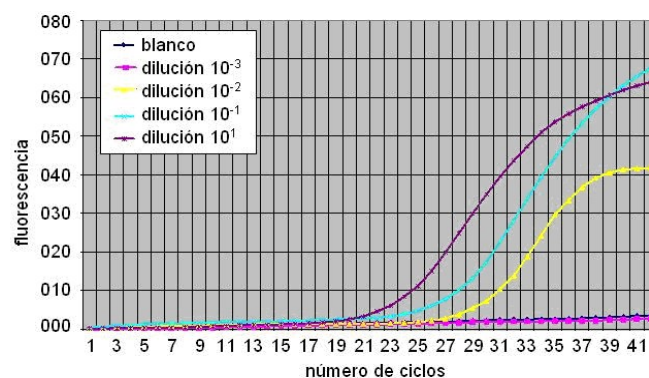


Figura 2. Efecto de la dilución de la muestra.

Las curvas de la Figura 2 indican una reacción eficiente. Teóricamente, al diluir la cantidad de ARN en diez veces, el C_T debería correrse en 3,3 [8] ciclos y aquí se observa aproximadamente este efecto. Los C_T de las primeras tres diluciones son, respectivamente, 21, 24 y 28.

Determinación de concentración de cebadores

Ensayamos distintas concentraciones de cebadores: 1 μM , 2 μM , 3 μM y 4 μM , cada una por triplicado.

La concentración de 3 μM fue la que proporcionó una mejor curva (Figura 3). A medida que aumentamos la concentración observamos un aumento del ΔRn y una disminución del C_T , hasta la concentración de 3 μM , luego de la cual no existe aumento posterior.

Se concluye en que la concentración de cebadores de 3 μM es la óptima.

Determinación del gradiente de concentración

Probamos la mejor temperatura para el hibridación de los cebadores entre 50 y 60 °C, utilizando una concentración de cebadores de 3 μM , y programando en el termociclador las distintas temperaturas para cada tubo de reacción en una única corrida.

Las dos mejores curvas obtenidas (menores C_T) fueron aquellas a las cuales los tubos de reacción se encontraban en las temperaturas de 50,5 °C

- 1 El ciclo umbral (C_T) es el ciclo en el cual hay un incremento significativo en ΔRn de forma que puede ser detectado por encima del ruido. El C_T es el punto de detección. Es el parámetro usado para la cuantificación ya que correlaciona con la cantidad inicial del blanco. ΔRn es un indicador de la magnitud de la señal generada por la PCR. Bajo ΔRn , en una reacción optimizada, indica problemas de diseño que conlleva a baja sensibilidad y bajo rango dinámico.

y 51,7 °C (Figura 4), por lo tanto, la temperatura de hibridación seleccionada fue 51°C.

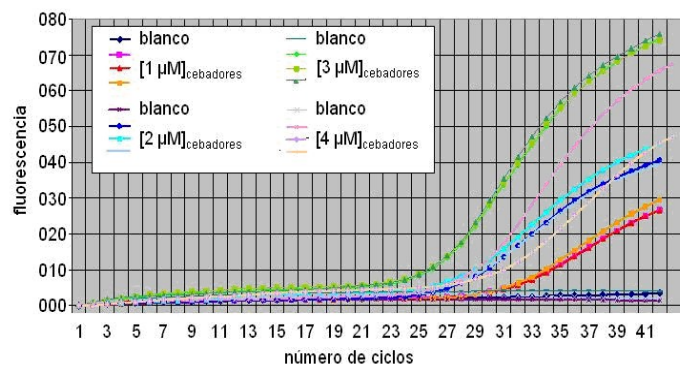


Figura 3. Efecto de la concentración de cebadores

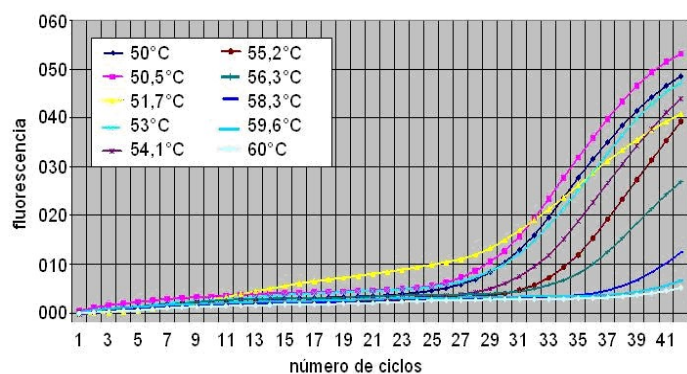


Figura 4. Efecto del gradiente de hibridación.

Determinación de la concentración de magnesio

Los kits comerciales para preparar las premix de RT-PCR en tiempo real contienen una concentración estándar de magnesio (3 mM final en el tubo de reacción), que funciona adecuadamente en la mayoría de las reacciones. De todas formas, en este trabajo probamos concentraciones más elevadas de magnesio para evaluar si mejoraba significativamente la cinética de reacción modificando este parámetro.

Comenzamos con un ensayo en el cual se prueban altas concentraciones de magnesio (5 mM, 7 mM y 9mM). El resultado fue inhibición total de la reacción en las tres concentraciones elevadas (datos no mostrados).

Luego realizamos otro ensayo probando las concentraciones de magnesio de 3,5 mM y 4 mM. Las curvas obtenidas tuvieron un C_T de 29 y 30 respectivamente (Figura 5). Esto indica que al aumentar la concentración de magnesio, en cierta medida, se inhibe la reacción. Por lo tanto, no se adicionó más magnesio a las premix, mantuvimos la concentración de la master mix que provee el kit.

Prueba de sensibilidad utilizando sondas TaqMan

Una vez establecidos los parámetros óptimos de reacción (temperatura de *annealing*: 51 °C; concentración de cebadores: 3 μM; concentración de magnesio: 3 mM) procedimos a realizar una prueba de sensibilidad a dilución infinita para tener una estimación de hasta qué punto llega a detectar el ARN esta reacción. Si bien no poseemos de un patrón para cuantificar la cantidad inicial del ARN, pudimos estimar que una curva con un $C_T=25$, tiene a una cantidad de 10^5 copias de molde (según experiencias previas del Laboratorio de Virología), sabiendo que la reacción tiene una eficiencia adecuada.

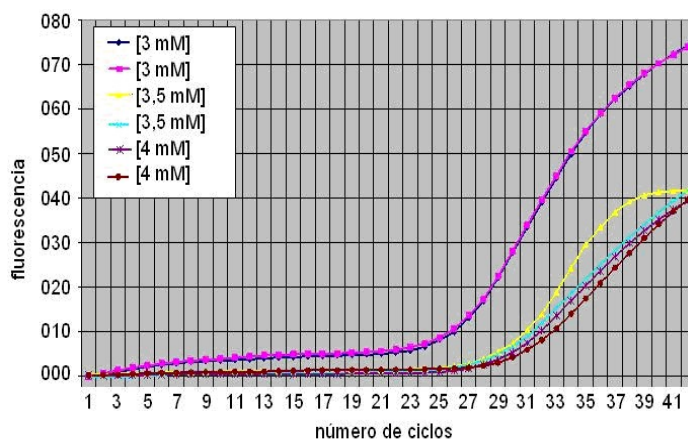


Figura 5. Efecto de la concentración de iones magnesio.

En la Figura 6 puede observarse que obtuvimos curvas con un C_T de 37. Esto indicaría que hay un número de 10 copias de molde. A la dilución 10^{-5} seguimos obteniendo curvas con un C_T de 37, pero uno de los triplicados da negativo. Esto significa que estaba muy diluida la muestra, y la probabilidad de atrapar molde de ARN con un volumen tan bajo (el que se coloca en el tubo de reacción) es pequeña. Entonces podríamos utilizar hasta una dilución 10^{-4} .

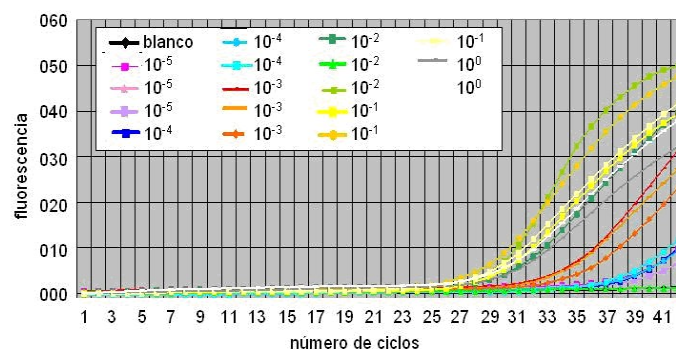


Figura 6. Sensibilidad de la técnica con sondas TaqMan

Se observa que no obtuvimos, como en las primeras pruebas, un C_T de 21 para la muestra sin diluir, sino que el C_T más pequeño fue de 27. Realizamos varias pruebas y este número no varió. Entonces llegamos a la conclusión de que fue debido a que para este momento se había empezado a utilizar una nueva vacuna, con las mismas características que la anterior, pero de una partida diferente. Por lo tanto, podría contener algún inhibidor en la matriz que impida el desarrollo óptimo de la reacción, y recién en la dilución 10^{-2} se comporta de manera igual a las primeras pruebas debido a la dilución de este inhibidor.

Prueba de sensibilidad utilizando SYBR Green

Decidimos ensayar otra técnica de RT-PCR en tiempo real, utilizando un fluoróforo inespecífico, *SYBR Green*. Este método permite caracterizar el amplicón realizando una curva de *melting*. En el termociclador se aumenta la temperatura y a cada tiempo se calcula la derivada de la fluorescencia (con valor negativo) respecto al tiempo, $-dF/dt$. De este modo, se obtiene un pico a cierta temperatura, la cual corresponderá a la desnaturalización

del producto. Para un amplicón de este tamaño (266 pb), el pico debería encontrarse a una temperatura mayor a 85 °C (según experiencias previas en el Laboratorio de Virología). Los picos que se encuentren a temperaturas más bajas, corresponderán a productos inespecíficos, como por ejemplo dímeros de cebadores.

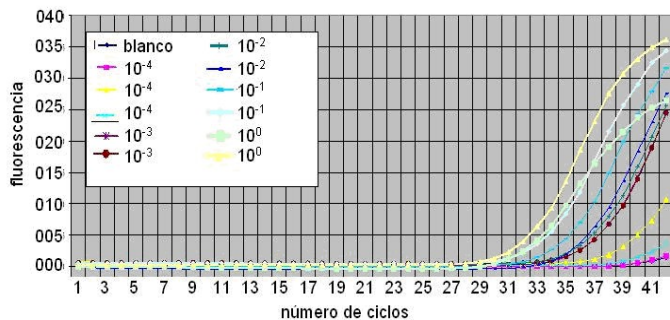


Figura 7. Sensibilidad de la técnica utilizando SYBR Green.

Observando la Figura 7, puede notarse que la eficiencia de reacción no es tan buena como ocurre con la técnica de TaqMan. Aquí los replicados no dan exactamente iguales y además al diluir en diez veces la muestra no se observa un corrimiento del C_T de 3,3 ciclos.

Analizando las curvas de *melting* observamos que los productos obtenidos en la dilución 10⁻⁴ son inespecíficos debido a que estos picos son pequeños, anchos y se encuentran a una temperatura menor a los 75 °C (Figura 8). Probablemente podrían pertenecer a dímeros de cebadores. Todas las demás diluciones contienen un pico alto y angosto a una temperatura de aproximadamente 87,2 °C, indicando que hay muy alta probabilidad de que se deba al amplicón deseado.

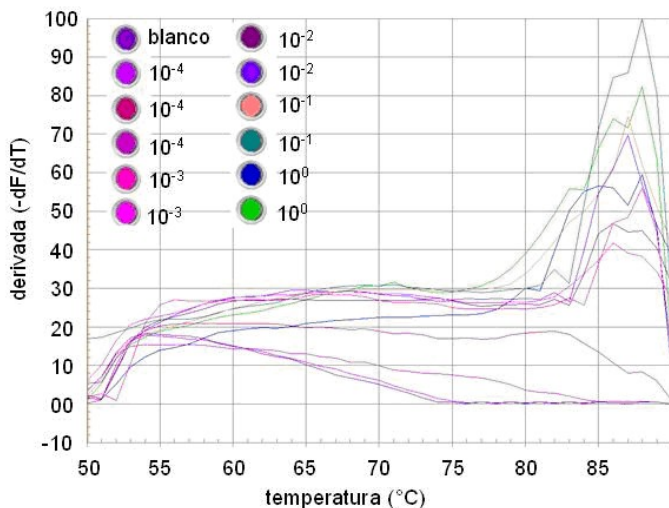


Figura 8. Curvas de melting.

Aunque obtuvimos con SYBR Green una reacción menos específica que con TaqMan, también podría utilizarse para diagnosticar Fiebre Amarilla, debido a que de todas maneras se obtiene y se detecta el amplicón buscado, aunque con menor sensibilidad.

Extracción de ARN viral con la técnica de desalting

Probamos un segundo método de extracción para comparar la eficiencia

de los métodos. Realizamos dos RT-PCR con distintas sondas. Las condiciones de reacción fueron: [3 μM]_{cebadores}, T° hibridación de 51°C, [3 mM]_{Mg}. La concentración de la sonda para la reacción con sonda TaqMan fue 250 nM y la concentración para la sonda SYBR Green fue la proveniente de la mezcla de reacción comercial utilizada.

Los resultados obtenidos fueron válidos, debido a que observando las Figuras 9 y 10 vemos que se obtuvieron muy buenas curvas con sus C_T y ΔRn muy aceptables.

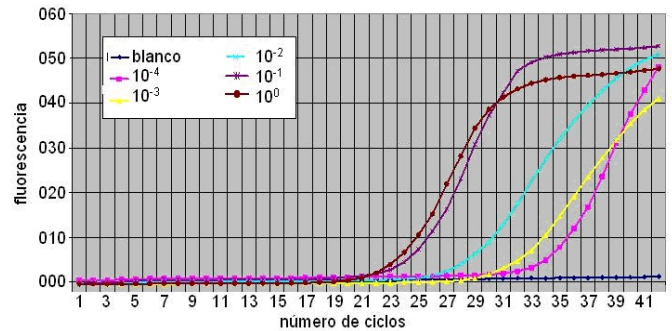


Figura 9. Efecto del método de extracción de ARN por desalting. (sonda TaqMan).

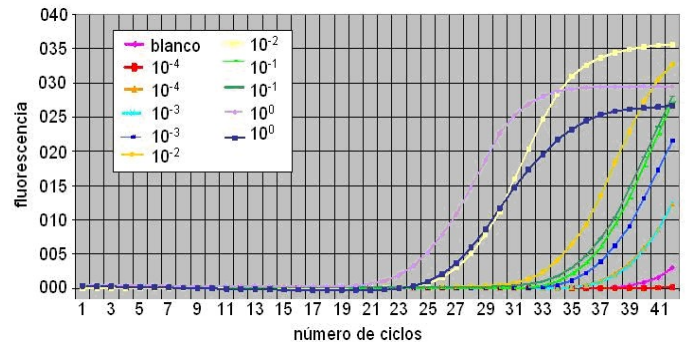


Figura 10. Efecto del método de extracción de ARN por desalting (SYBR Green)

DISCUSION

La idea inicial del presente trabajo era conseguir poner a punto la técnica de PCR para detectar el virus de Fiebre Amarilla en muestras biológicas. Aunque este objetivo no se consiguió, el amplio rango dinámico (hasta 4 órdenes de magnitud) y la eficiencia de reacción logrados nos permite formular la hipótesis de que la aplicación de la técnica en este tipo de muestras con fines diagnósticos es altamente probable. Desde la primera prueba realizada, la eficiencia de reacción fue muy buena. Calculando la regresión lineal de los puntos dados por la gráfica de log [muestra] vs. C_T con el método de cuadrados mínimos se obtiene una pendiente de -3,5 con un r² = 0,9932 y un α = 0,05 (datos de la Figura 2). Los valores asignados a los logaritmos son arbitrarios debido a que no conocemos la concentración inicial de ARN que se obtiene luego de la extracción, pero sabemos exactamente que se diluyó la muestra inicial en un factor de 10 cada vez. Los valores absolutos de pendiente aceptables son entre 3,18 y 3,6 pero el valor óptimo es 3,3 [8], por lo tanto, la pendiente obtenida es aceptable, la reacción tiene una alta especificidad pero podría mejorarse la sensibilidad. La especificidad está basada en la amplificación específica del amplicón y puede estimarse a partir de la pendiente de la recta de la gráfica de log[muestra] vs C_T. En cambio la sensibilidad es proporcional al valor del

eje Y donde interseca esta recta. Cuanto menor sea este valor, mayor será la sensibilidad, debido a que puede detectarse el amplicón a una menor concentración de muestra.

log [muestra]	C _T
log 10 ⁵	21
log 10 ⁴	24
log 10 ³	28

pendiente = -3,5

Luego de optimizar los parámetros de la reacción y ensayar la sensibilidad de la técnica de TaqMan con previa extracción de ARN viral con columna o con la técnica de *desalting*, se obtiene una pendiente de -3,3 con un $r^2 = 0,915$ a un $\alpha = 0,02$ y $r^2 = 0,9828$ a un $\alpha = 0,05$ (Figuras 6 y 9, respectivamente), indicando que la reacción sigue siendo específica y se mejoró la sensibilidad.

log [muestra]	C _T
log 10 ⁵	28
log 10 ⁴	~28,5
log 10 ³	~34,5
log 10 ²	37

pend = -3,3

log [muestra]	C _T
log 10 ⁵	22
log 10 ⁴	24
log 10 ³	27
log 10 ²	31
log 10	35

pend = -3,3

Puede aproximarse la cantidad de copias presentes en la mezcla de reacción utilizando datos de trabajos realizados previamente. La vacuna utilizada como muestra, luego de la reconstitución, contiene al menos 1.000 DL50 por cada dosis de 0,5 ml (datos extraídos del prospecto de la vacuna). Pero reconstituimos la vacuna en la mitad del volumen de diluyente provisto, por lo tanto, la muestra contiene al menos 2.000 DL50 por cada 0,5 ml. Luego, la relación pfu/DL50 es de un factor de 0,69 (dato extraído del prospecto de la vacuna) por lo que en 0,5 ml hay 3.800 pfu (unidades formadoras de placas). Según el trabajo de Day-Yu Chao y cols. (2007), generalmente, el número de copias por 1 pfu es entre 1.000 y 3.000 (el nivel de incertidumbre es exacerbado por existir diferencias entre cepas virales, condiciones del cultivo de tejido y el tiempo que el virus estuvo almacenado). Y por último, el porcentaje de eficiencia de extracción de ARN del método con columnas fue de aproximadamente un 80 % (según el kit comercial utilizado la eficiencia sería de un 90%, pero por la falta de experiencia de la tesista en las técnicas, aproximamos la eficiencia de extracción a un 80%). En la mezcla de reacción para realizar la PCR se colocan 5 µl de muestra, por lo tanto, este tubo contendría unas $2,208 \times 10^4$ copias de ARN (utilizando un promedio de 2.000 copias por 1 pfu).

De acuerdo a la sensibilidad de la prueba de TaqMan con previa extracción del ARN con el método de columna, se sigue detectando el virus hasta una dilución 1/100.000, por lo que podrían detectarse hasta 0,2208 copias del virus. Esto no es físicamente posible, pero se obtiene este número debido a que los cálculos no son exactos, en primer lugar porque los datos de la vacuna dicen "al menos" 1.000 DL50 por 0,5 ml, y después por el error en

calcular que 1 pfu serán 2.000 copias del virus. De todas formas, estos números indican que la sensibilidad de la reacción es muy alta, y en muestras biológicas es muy probable que se lleguen a detectar las copias de virus que se encuentren en ellas.

CONCLUSIONES.

Pudo ponerse a punto una reacción para detectar el virus de la fiebre amarilla con una RT-PCR en tiempo real, obteniendo una reacción con un amplio rango dinámico. Además se pudo optar por dos métodos de extracción del ARN viral (columnas de adsorción y *desalting*) y dos tipos de fluoróforos para detectar la fluorescencia en tiempo real (TaqMan y *SYBR Green*). Cualquier combinación de estos métodos (uno de extracción y otro de detección de fluorescencia) es útil para detectar el virus de la Fiebre Amarilla, encontrándose con TaqMan una eficiencia de reacción mayor a la de *SYBR Green*.

REFERENCIAS

- [1] **Medline Plus. Información de salud para usted. Disponible en:** <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/001365.htm>. Visitado en noviembre de 2010.
- [2] **Fiebre Amarilla.** Disponible en: http://virus.med.puc.cl/viajero/f_amarilla.html. Visitado en noviembre de 2010.
- [3] N.H. Acheson, "Flavivirus," *Fundamentals of Molecular Virology*. John Wiley & Sons, Inc.; 1 edition (10 de Noviembre, 2005).
- [4] R.S. Lanciotti, "Molecular amplification assays for the detection of flaviviruses". *Adv Virus Res* 61, 2003, 67-99.
- [5] J. Costa, "Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real", 2010 Disponible en: <http://external.elsevier.es/espacioformacion/eimc/temas/m2t12.pdf>. Visitado en noviembre de 2010.
- [6] L.J. Chien, et al., "Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses," *J Clin Microbiol*, 44(4), 2006, 1295-304.
- [7] D.Y. Chao, B.S. Davis, y G.J. Chang, "Development of multiplex real-time reverse transcriptase PCR assays for detecting eight medically important flaviviruses in mosquitoes," *J Clin Microbiol*, 45(2), 2007, 584-589.
- [8] Corporation, L.T., *Real-time PCR handbook*. 2012.