

DETECCIÓN DE PATÓGENOS MEDIANTE PCR

Belén Rodríguez Sánchez, Ana Pérez de Diego Camacho, Deborah Kukielka Zunzunegui y José Manuel Sánchez-Vizcaino
Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid.

Gráfico 1

1. El material de partida para realizar un ensayo de PCR (Polymerase Chain Reaction, Reacción en Cadena de Polimerasa) suele ser sangre o suero del animal que se quiere analizar, pero en algunos casos también se puede utilizar otro tipo de muestras

2. como orina, heces, hisopos nasales, tejidos, etc., que requieren un menor manejo del animal y pueden aportar información adicional.

3. Una vez obtenida la muestra, se procede a su homogenización, en caso de tejidos o heces. En los demás casos, la muestra se puede conservar en frío hasta que se realice la extracción de ácidos nucleicos

4. Uno de los métodos más utilizados para la extracción de ARN es el reactivo Trizol, que contiene una mezcla de solventes orgánicos que facilitan la separación de los componentes de la muestra estudiada en dos fases: fase orgánica, en la que se encuentran restos de membranas celulares, orgánulos y otros compuestos con alto contenido lipídico y fase acuosa, donde se encuentra el ARN debido a su fuerte carga iónica.

5. Una alternativa al Trizol, son los kits de extracción por columnas de sílice. Existen en el mercado distintos kits que permiten extraer tanto ADN como ARN a partir de distintas muestras biológicas. Las columnas

Otra manera de monitorizar el incremento de ADN amplificado es mediante la incorporación de moléculas que emiten fluorescencia, como el SYBR-Green

están cargadas positivamente, lo que permite una fuerte interacción con las cargas negativas del DNA. Los kits para extracción de ARN utilizan isotiocianato de guanidina, una molécula que proporciona un ambiente ácido en el que permanece el ARN, mientras que el ADN precipita.

6. El ácido nucleico purificado y resuspendido en agua ultrapura está en condiciones óptimas para ser amplificado por PCR

Gráfico 2

A. La amplificación de ácidos nucleicos a partir de ARN requiere un paso previo a la PCR, en el que, mediante la enzima Transcriptasa Reversa (RT), se copia el ARN de la muestra en ADN, única molécula a la que se une la enzima polimerasa durante la PCR.

B. Una vez obtenido ADN en el paso A, se procede a la realización de la PCR, que puede tener lugar en un solo paso. La PCR consta de 3 etapas:

✓ **Desnaturalización:** en la que las dos cadenas del ADN se separan mediante calor. Una vez sepa-

radas las cadenas, la muestra se enfría rápidamente para evitar que las cadenas puedan volver a unirse.

✓ **Anillamiento:** entre 50-60°C se produce la unión de los oligonucleótidos o primers a sus secuencias complementarias, que flanquean la región del ADN que se va a amplificar.

✓ **Elongación:** la enzima ADN polimerasa es una molécula termoestable que tiene máxima actividad a 72°C y que es capaz de amplificar un fragmento de ADN a partir del extremo 3' libre de cada uno de los primers.

Se repite este proceso desde el paso 1 entre 30 y 40 veces, lo que permite un aumento logarítmico del número de copias de ADN de interés.

Gráfico 3

1. Para poder visualizar el producto de PCR obtenido, se utilizan de manera habitual geles de agarosa al 1-2% (peso/volumen) que permiten separar los fragmentos de ADN por su tamaño molecular. Estos geles se tiñen con colorantes



Gráfico 1

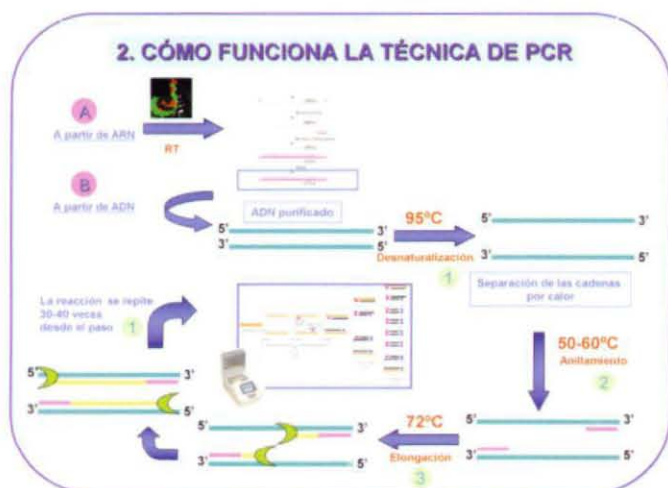


Gráfico 2

3. VISUALIZACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR

1. ELECTROFORESIS EN AGAROSA Y TINCIÓN CON SYBR-GREEN



2. FLUORESCENCIA (PCR a tiempo real)



Gráfico 3

que presentan afinidad por la molécula de ADN de doble cadena, como son el Bromuro de Etidio o el SYBR Green, que ha sustituido al Bromuro de Etidio por su mayor afinidad por el ADN y su menor toxicidad.

2. Otra manera de monitorizar el incremento de ADN amplificado es mediante la incorporación de moléculas que emiten fluorescencia, como el SYBR-Green. Estas moléculas pueden unirse de manera inespecífica a las cadenas dobles de ADN o pueden ir ligadas tanto a los primers como a las sondas TaqMan de las que se habla más adelante. Los termocicladores a tiempo real incorporan un sistema de lectura de fluorescencia que permiten dibujar gráficos como el de la derecha, en el que se ve cómo aumenta la fluorescencia, y por tanto el número de copias de ADN, a medida que avanza el número de ciclos en la PCR.

4. PCR A TIEMPO REAL

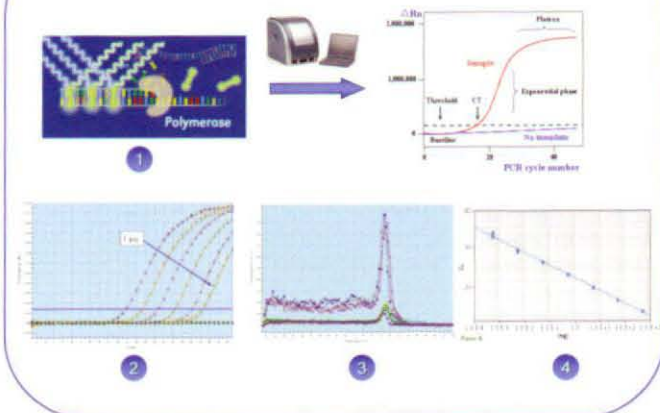


Gráfico 4

Gráfico 4

1. La PCR a tiempo real permite conocer el resultado para cada muestra desde el comienzo de la reacción. Se establece un valor umbral de fluorescencia, a partir del cual se considera que una muestra es positiva, no siendo necesario llegar al final del último ciclo para obtener el resultado. La forma más sencilla de realizar PCR es utilizando el fluoróforo SYBR Green, que se une de manera inespecífica a ADN de doble cadena. El termociclador a tiempo real lee la fluorescencia emitida por el fluoróforo que se va incorporando a las moléculas de ADN sintetizadas en cada ciclo y representa estos valores.

2. Gráfico que representa el aumento de ADN en la mezcla a medida que se suceden los ciclos de PCR. A partir de cierto número de ciclos se produce un aumento exponencial del número de copias de ADN que va disminuyendo al final de la reac-

ción a medida que los reactivos se agotan.

3. Otra forma de evaluar la amplificación de ADN es mediante la realización de curvas de disociación, en las que todo el ADN producido se desnaturaliza y se le permite renaturalizar lentamente. A la temperatura a la que el producto de PCR se renaturaliza existe un aumento de fluorescencia debido a que gran cantidad de SYBR Green se une a este producto de doble cadena. Esto permite diferenciar el producto de PCR del dímero de primer

4. Mediante la realización de diluciones seriadas de una muestra de concentración conocida, la técnica de PCR a tiempo real con SYBR Green permite hacer cálculos semicuantitativos de la concentración de muestras desconocidas.

Gráfico 5

1. Existe en la actualidad una gran

5. PCR A TIEMPO REAL II. TIPOS

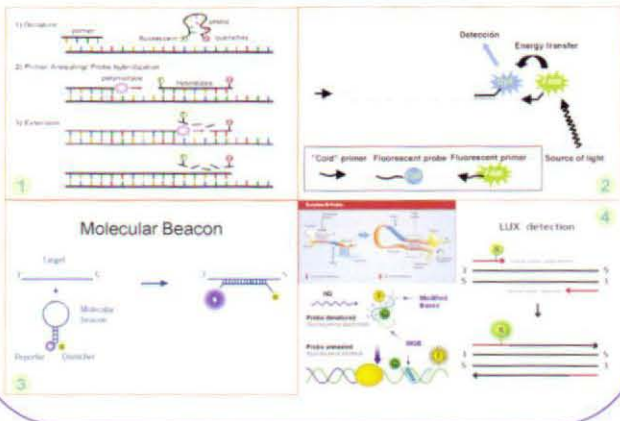


Gráfico 5

6. PCR ISOTÉRMICA

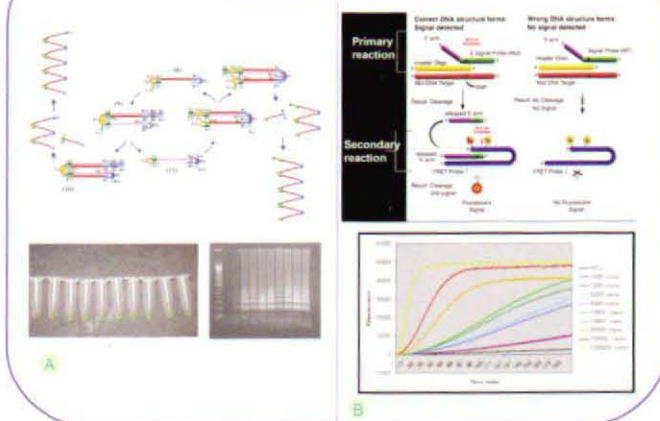


Gráfico 6

variedad de estrategias que permiten realizar PCR a tiempo real de manera más específica que con SYBR Green y que además facilitan la cuantificación del número de copias del ADN de interés en las muestras analizadas. Una de las más extendidas es la utilización de sondas TaqMan. Estas sondas son como un primer más, que se une de manera complementaria a una región del ADN flanqueada por los primers. En el extremo 5' de la sonda se une químicamente un compuesto fluorescente y en el extremo 3', una molécula que absorbe la fluorescencia del anterior. La polimerasa empleada en este caso tiene actividad 5'-exonucleasa. Así, cuando la enzima llega al lugar del DNA donde se ha unido la sonda, libera uno por uno los nucleótidos de ésta, el fluoróforo se aleja de la molécula que absorbe su energía y emite fluorescencia que registra el termociclador.

2. Otra estrategia es la utilización de sondas FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). En este caso, se utiliza un primer 5' no marcado, y una sonda y un primer 3' marcados con un compuesto fluorescente. Sólo cuando cada uno de estos tres compuestos se une en el orden correcto, el fluoróforo unido al primer transmite su energía al que está unido a la sonda (necesitan estar a poca distancia) y éste emite fluorescencia, que es la que indica que se está produciendo amplificación del ADN.

3. Los "molecular beacons" son moléculas con extremos complementarios que les permiten mante-

nerse en conformación cerrada cuando están libres en la muestra, haciendo que su fluoróforo esté muy próximo a una molécula que absorbe su energía. Sin embargo, cuando se unen a su secuencia complementaria, estas moléculas se abren, haciendo que el fluoróforo esté lo suficientemente alejado de la molécula que absorbe su energía para emitir fluorescencia que podrá ser registrada por el termociclador.

4. En los últimos años se han desarrollado sondas que contienen en su extremo 3' una molécula que se une al surco menor (MGB) del DNA, facilitando una unión más estable y duradera. También se han diseñado primers que incorporan moléculas fluorescentes y que producen una señal al unirse a su secuencia complementaria. Esta técnica se conoce como LUX (Light Upon eXtension).

Gráfico 6

El desarrollo de nuevas polimerasas con elevada afinidad por el ADN y muy estables a alta temperatura ha permitido realizar un tipo de amplificación de ácidos nucleicos que no requiere termociclador porque toda la reacción tiene lugar a la misma temperatura (65°C). Estas PCRs termoestables son muy fáciles de transferir a laboratorios donde no existen aparatos de PCR sofisticados y además, permiten visualizar el resultado sin necesidad de equipos de detección. La PCR isotérmica más ampliamente extendida se conoce como LAMP-PCR (Loop-mediated isothermal AMplification) y

consiste en la utilización de tres pares de primers que permiten amplificar secuencias de DNA que polimerizan y forman superestructuras a las que se une SYBR-Green, produciendo un compuesto verde cuando la reacción tiene lugar.

Otro tipo de PCR isotérmica es la PCR-Invader, en la que se utiliza una enzima llamada Flap-endonucleasa y un primer denominado "invasor". La endonucleasa reconoce la estructura que se forma cuando el primer invasor y una sonda marcada solapan con el fragmento de ADN de interés. Esta reacción sólo se produce cuando la complementariedad entre primer y secuencia de ADN es perfecta, lo que permite distinguir cepas que se diferencian en unos pocos nucleótidos.

Gráfico 7

Desde hace pocos años se ha comenzado a desarrollar sistemas portátiles que permiten acercar el laboratorio a la granja. Estos equipos realizan tanto la extracción de ácidos nucleicos como la amplificación de la región de ADN de interés mediante PCR, en muy poco tiempo. Los últimos modelos son capaces de analizar hasta 5 muestras a la vez, son muy versátiles, se puede utilizar distintos tipos de muestras y el equipo se desinfecta mediante inmersión.

Gráfico 8

Ejemplos de algunas de los ensayos de PCR convencional, a tiempo real e isotérmica que se aplican de manera rutinaria en laboratorios de diagnóstico europeos.

7. EQUIPOS PORTÁTILES DE PCR



Ensayos adaptados para la detección del virus de la fiebre aftosa y el virus de la gripe aviar (Smiths Detection, UK)

8. APLICACIONES

PCR CONVENCIONAL

Fernández J, Agüero M, Romero S, Sánchez C, Betak S, Ariza M, Sánchez-Vizcaino JM. Rapid and differential diagnosis of foot-and-mouth disease, swine vesicular disease, and vesicular stomatitis by a new multiplex RT-PCR assay. *J Virol Methods*. 2008 Feb;147(2):301-11

PCR A TIEMPO REAL

Hakhteriyani M, Rasmussen TB, Thomsen P, Uttenfuhl A, Betak S. Development of a real-time PCR assay based on primer-probe energy transfer for the detection of swine vesicular disease virus. *Arch Virol*. 2008 Dec;151(12):2365-76

Rasmussen TB, Uttenfuhl A, Agüero M. Detection of three porcine vesicular viruses using multiplex real-time primer-probe energy transfer. *J Virol Methods*. 2008 Jun;134(1-2):176-82

McKillop J, Hertner B, Miller A, McNally E, Betak S, Ader S, Allan G. Molecular beacon real-time PCR detection of swine viruses. *J Virol Methods*. 2007 Mar;140(1-2):155-65

PCR ISOTÉRMICA

Bloomfield AL, Hakhteriyani M, Reed SM, Dukas JP, King DP, Betak S, Berg M. A one-step reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification assay for simple and rapid detection of swine vesicular disease virus. *J Virol Methods*. 2008 Jan;147(1):189-93

Gráfico 7

Gráfico 8