

Estandarización de una técnica de RT-PCR anidada para detección de alfavirus

Cynthia Magdalena Bernal Vera^I, Fátima María Cardozo Segovia^{II}, Laura Patricia Mendoza Torres^{II}

I Estudiante de la Carrera de Bioquímica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción, Paraguay

II Departamento de Salud Pública, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción, Paraguay

**Cómo referenciar este artículo/
How to reference this article:**

Bernal CM, Cardozo FM, Mendoza LP.
Estandarización de una técnica de RT-PCR anidada para detección de alfavirus. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud.* 2017; 15(2): 30-36

RESUMEN

El género *Alphavirus* está constituido por virus de ARN de los cuales, varias especies son causantes de enfermedades humanas y animales como los virus chikungunya, Mayaro y los virus de encefalitis equinas, por lo que son considerados un problema de salud pública a nivel regional. En Paraguay han sido reportadas infecciones humanas por chikungunya pero son necesarios más estudios para ampliar conocimientos sobre circulación y ecoepidemiología de los alfavirus. La transcripción reversa de ARN seguida de una reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) anidada es de gran utilidad como herramienta diagnóstica y en la vigilancia epidemiológica. El objetivo de este estudio fue definir las condiciones óptimas de reacción y determinar el límite de detección para una RT-PCR anidada para la detección genérica de alfavirus. El límite de detección obtenido, de 0,47 UFP/mL, indica una alta sensibilidad, pudiéndose aplicar la técnica a muestras humanas y animales de suero, líquido cefalorraquídeo, órganos y a pools de mosquitos. Este trabajo servirá de base a otros estudios de detección e identificación de especies de alfavirus circulantes en nuestro país, lo que contribuiría a fortalecer su vigilancia y prevención.

Palabras clave: *Alphavirus*, RT-PCR anidada, estandarización.

Standardization of a nested RT-PCR technique for alphavirus detection

ABSTRACT

The genus *Alphavirus* consists of RNA viruses of which several species are responsible for human and animal diseases, such as chikungunya, Mayaro and equine encephalitis viruses, and are therefore considered a regional public health problem. In Paraguay, human infections have been reported by chikungunya, but more studies are needed to increase knowledge on the circulation and ecoepidemiology of alphaviruses. Reverse RNA transcription followed by a nested polymerase chain reaction (RT-PCR) is very useful as a diagnostic tool and in epidemiological surveillance. The objective of this study was to define optimal reaction conditions and to determine the limit of detection for a nested RT-PCR for generic alphavirus detection. The detection limit obtained, of 0,47 PFU/mL, indicate high sensitivity, and the possibility of applying the technique to human and animals samples of serum, cerebrospinal fluid, organs and mosquito pools. This work will serve as a basis for other studies of detection and identification of alphavirus species circulating in our country, which would help strengthen the surveillance and prevention.

Keywords: *Alphavirus*, nested RT-PCR, standardization.

Fecha de recepción: abril 2017. Fecha de aceptación: julio 2017

Autor correspondiente: Laura Mendoza, Departamento de Salud Pública, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción, Cecilio Báez, CP 930, Campus Universitario, San Lorenzo, Paraguay.

Email: lauramendozaatorres@gmail.com

INTRODUCCIÓN

El género *Alphavirus* incluye a 31 especies virales (1) cuyo genoma consiste en una cadena de ARN 49S de sentido positivo de aproximadamente 11.400 nucleótidos que codifica para las proteínas estructurales y no estructurales (2). Se clasifican basados en las características fenotípicas y filogenéticas que los dividen en dos grupos: los virus artríticos o del Viejo Mundo, donde resaltan los virus O'nyong nyong (ONNV), Sindbis (SINV), chikungunya (CHIKV), Semliki Forest (SFV) y Ross River (RRV). Y por otro lado, los virus encefalíticos o del Nuevo Mundo con referentes como el virus Mayaro (MAYV), virus de encefalitis equina venezolana (VEEV), virus de encefalitis equina del este (EEEV) y el virus de encefalitis equina occidental (WEEV) (2).

Para establecer y mantener un ciclo de transmisión viral tres factores son esenciales: el virus, un artrópodo que actúa como vector y un vertebrado, que actúa como hospedador (2). Los vectores son casi en su totalidad mosquitos de la familia *Culicidae* de los géneros *Aedes* y *Culex* (3). La mayoría de aquellos transmitidos por *Culex* tienen reservorios aviares y causan enfermedades similares a encefalitis en los huéspedes (3). Los que son transmitidos por especies del género *Aedes* tienen por reservorios a primates o circulan entre humanos y mosquitos, sin un reservorio animal adicional en los llamados ciclos selvático o urbano (3).

Los síntomas clínicos de las alfaviriosis varían de fiebre y sarpullidos a patologías inflamatorias significativas incluyendo encefalitis y artritis severa (2).

La distribución de los alfavirus es mundial y han sido reportados en todo el continente americano (4). Entre los de importancia médica detectados en Brasil y Argentina se encuentran el VEEV (Pixuna y Río Negro), EEEV, WEE, MAYV, CHIKV (5). En lo que respecta a Paraguay, en junio del 2014 se reportó el primer caso de alfaviriosis, específicamente atribuido al CHIKV (6), siendo este el único de su género estudiado hasta la fecha en el país. Sin embargo, es de esperar que circulen otros alfavirus debido a la presencia de gran variedad de especies de mosquitos (7) y de aves (8) en el territorio que pueden actuar como vectores y reservorios, respectivamente además de las condiciones climáticas, la deforestación y otros factores favorables (3).

La transcripción reversa de ARN seguida de una reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) anidada es una herramienta rápida, sensible y específica en el estudio de virus (9-11). Los cebadores diseñados por Sánchez Seco *et al.* (9) amplifican el gen nsP4, altamente conservado en todos los alfavirus (2), lo que permite una detección genérica. Por ello, se diseñó este estudio con el objetivo de estandarizar y determinar el límite de detección de una técnica de RT-PCR anidada para la detección de alfavirus.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño y muestras utilizadas

Se llevó a cabo un estudio observacional descriptivo de corte transversal.

Como control positivo para la optimización de la RT-PCR anidada para alfavirus se utilizaron aislados de las cepas de VEEV IAB (TC-83) y VEEV subtipo VI (AG80-663), que fueron cedidos por el Laboratorio de Arbovirus del Instituto de Virología JM Vanela de la Universidad Nacional de Córdoba, UNC, Argentina. Como control negativo se utilizó agua libre de RNasa (*Amresco, Canadá*).

Para determinar el límite de detección se utilizó una cepa de VEEV subtipo VI (AG80-663) aislado de mosquitos *Culex (Melanoconion) delpontei* con título de $4,6 \cdot 10^8$ UFP/mL. En la Figura 1 se observa un flujograma del trabajo llevado a cabo.

Extracción de ARN viral

Para extraer ARN a partir de controles positivos se utilizó un kit comercial (*QIAamp Viral RNA, USA*) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El volumen de muestra utilizado para la extracción fue de 140 μ L y la elución se realizó en un volumen total de 60 μ L de tampón de elución agregado en dos etapas de 30 μ L para aumentar el rendimiento. El ARN extraído fue almacenado a -70°C hasta su procesamiento.

Retrotranscripción

La retrotranscripción se realizó para la obtención de ADN complementario (ADNc) utilizando cebadores aleatorios que consisten en un ADN sintético de seis nucleótidos con secuencias aleatorias de las bases A, T, C y G (*Biodynamics, Argentina*).

Esta reacción se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones de la transcriptasa reversa (*Thermo Scientific RevertAid H Minus Reverse Transcriptase, EEUU*) (12). Se preparó la mezcla de reacción con 5 µL de la muestra de ARN extraído, 4 µL de buffer 5x, 8 µL de desoxinucleótidos trifosfato 2,5 mM (dNTPs: dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 1 µL de cebador aleatorio, 1 µL de transcriptasa reversa 200 U/µL, 0,5 µL de inhibidor de ribonucleasa 40 U/µL (*Thermo Scientific RiboLock RNase Inhibitor, USA*) y 0,5 µL de agua libre de RNasa y de ADNasa (*Amresco, Canadá*). Los tubos, con un volumen final de 20 µL, fueron incubados en termociclador Esco Healthcare Swift – Max Pro a 25°C por 10 minutos, luego 120 minutos a 42°C y 10 minutos a 70°C (12).

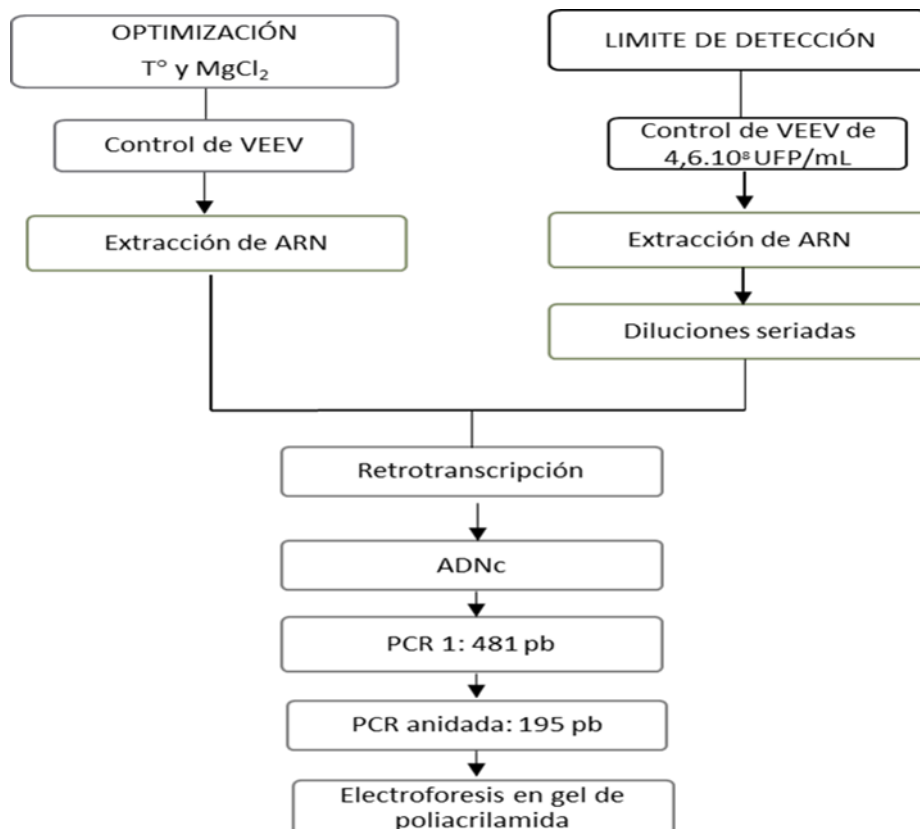


Figura 1. Flujograma de trabajo

Optimización de la PCR anidada

La detección del genoma de alfavirus en controles positivos se realizó a través de la reacción de RT-PCR anidada genérica descrita por Sánchez Seco *et al.* en el 2001 (10).

Posteriormente, los productos de amplificación obtenidos fueron sometidos a corrida electroforética en gel de poliacrilamida al 7% seguida de tinción con nitrato de plata descrita por Sanguinetti *et al.* (13). Para identificar el tamaño de banda se utilizó marcador de 100 pares de bases (*Thermo Scientific, USA*). La técnica se probó con concentraciones diferentes de MgCl₂ y diferentes temperaturas de alineamiento (Ta) para la PCR anidada.

Determinación del límite de detección

Para hallar el límite de detección fueron preparadas diluciones seriadas tomando 5 μL del ARN extraído y mezclándolo con 45 μL de agua libre de ARNs (Amresco, Canadá). Las diluciones para llevar a cabo la reacción fueron entre 10^{-4} hasta 10^{-11} a fin de determinar hasta qué título es posible detectar el genoma de alfavirus.

Posteriormente se realizó la transcripción reversa, tal como ya se describió, y la amplificación del gen nsP4 por la RT-PCR anidada previamente optimizada. El límite de detección se calculó en base a la última dilución donde fue observada amplificación mediante la aparición de las bandas en gel de poliacrilamida teñido con nitrato de plata (13). El ensayo se realizó por triplicado.

RESULTADOS

Estandarización de la RT-PCR anidada para detección de alfavirus

Respecto a la temperatura de alineamiento (T_a), al utilizar el control VEEV VI (AG80-663) se observó amplificación a ambas temperaturas testadas, 52°C y 54°C, sin diferencias en la intensidad de las bandas obtenidas. Por otro lado, con la utilización del control VEEV IAB (TC 83) a 52°C se visualizaron bandas, tanto en la amplificación del control puro como de la dilución 1/2, pero fueron más tenues que las obtenidas con el control anterior. Sin embargo, a 54°C no se visualizaron bandas. En la Figura 2 se observa la corrida electroforética de los productos de amplificación obtenidos en las diferentes temperaturas testadas con los dos controles utilizados.

Al comparar los resultados obtenidos con ambos controles se evidenció que en los casos donde se obtenía una banda de amplificación más tenue a 52°C no se observó amplificación a 54°C. Con base en estos resultados la temperatura seleccionada fue de 52°C.

Con respecto a la concentración de MgCl_2 para la reacción de PCR anidada, como puede apreciarse en la Figura 3, al no observarse diferencias en la definición de las bandas a dos diferentes concentraciones, se optó por utilizar la concentración final de 2,0 mM.

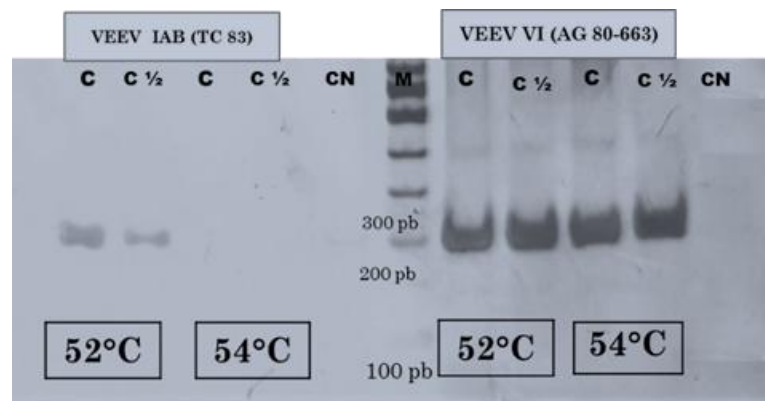


Figura 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7% de los productos amplificados para el fragmento del gen nsP4 de alfavirus probado a diferentes temperaturas. Carriles 1 al 5 control VEEV IAB (TC 83). (1) Control puro, $T_a= 52^\circ\text{C}$. (2) Dilución 1:2, $T_a= 52^\circ\text{C}$. (3) Control negativo, $T_a= 52^\circ\text{C}$. (4) Control positivo puro, $T_a= 54^\circ\text{C}$ (5) Dilución 1:2, $T_a= 54^\circ\text{C}$. (6) marcador de 100 pb. Carriles 7 al 10 control VEEV VI (AG80-663). (7) Control puro, $T_a= 52^\circ\text{C}$. (8) Control diluido, $T_a=52^\circ\text{C}$. (9) Control puro, $T_a=54^\circ\text{C}$. (10) Control diluido, $T_a=54^\circ\text{C}$. (11) Control negativo $T_a= 54^\circ\text{C}$.

Finalmente, para la electroforesis en gel de poliacrilamida al 7%, efectuada según Sanguinetti *et al.* (13), el tiempo de corrida fue optimizado a 120 minutos, ya que así se mejoró la visualización de las bandas.

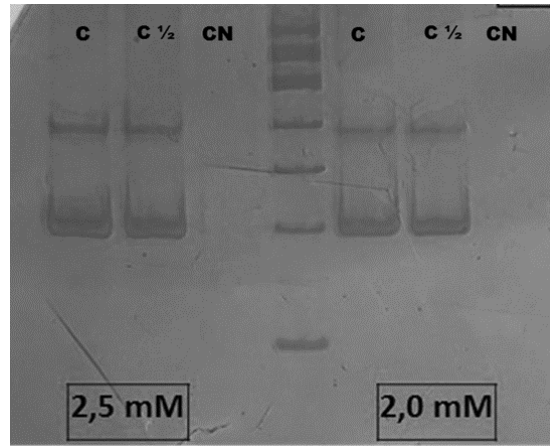


Figura 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7% de los productos amplificados para el fragmento del gen nsP4 de alfavirus utilizando el control VEEV VI (AG80-663). (1) Control puro, $[MgCl_2]= 2,5 \text{ mM}$. (2) Dilución 1:2, $[MgCl_2]= 2,5 \text{ mM}$ (3) Control negativo. (5) marcador de 100 pb. (4) control puro $[MgCl_2]= 2,0 \text{ mM}$. (5) dilución 1:2 del control, $[MgCl_2]= 2,0 \text{ mM}$. (6) Control negativo.

Límite de detección

El límite de detección obtenido fue de 0,46 UFP/mL o $5,36 \cdot 10^{-3}$ UFP/reacción. En la Figura 4 se puede observar que el control de alfavirus de la cepa VEEV (AG86-663) con título de $4,6 \cdot 10^8$ UFP/mL resultó positivo hasta la dilución 10^{-9} .

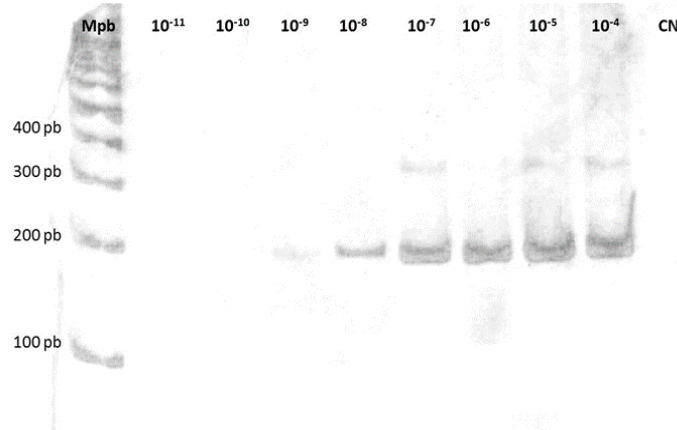


Figura 4. Límite de detección de la RT-PCR anidada para alfavirus utilizando los cebadores de Sánchez Seco *et al.* (9). Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7% de los productos amplificados para el fragmento del gen nsP4 de alfavirus. Carril 1: marcador de 100 pb (Mpb). Carriles 2 al 9: diluciones del control positivo de VEEV 663 desde 10^{-11} al 10^{-4} (ensayo realizado por triplicado).

DISCUSIÓN

Los alfavirus son considerados un problema de importante impacto en salud pública pudiendo causar desde casos febriles hasta casos fatales (2, 14, 15). También constituyen un desafío en sanidad animal (16). Esta técnica fue seleccionada debido a que ha demostrado ser útil para detectar alfavirus de varias especies (9, 10, 11). En este trabajo fueron incluidas algunas modificaciones a la reacción descrita por Sánchez Seco *et al.* (9), como la utilización de cebadores aleatorios en la retrotranscripción, lo cual confiere ciertas ventajas como el aprovechamiento de un

mismo ADNc para otros fines como el estudio de otros arbovirus, ahorrando de esta forma tiempo y reactivos. Otra ventaja es que se evitan los múltiples descongelamientos que pueden conducir a la degradación del ARN viral.

Al utilizar la temperatura de alineamiento de 52°C con el control VEEV VI (AG80-663), se observó amplificación con bandas de intensidad fuerte a ambas temperaturas, sin embargo, al utilizar el control VEEV IAB (TC 83) se evidenció una amplificación con bandas tenues a 52°C y no se observó amplificación a 54°C. Esto podría sugerir que a 52°C la sensibilidad es favorecida pero, para confirmarlo debe hacerse el ensayo con controles de carga viral conocida. La temperatura de alineamiento elegida finalmente fue de 52°C, tal como lo describieron Sánchez Seco *et al.* (9).

Con respecto a la concentración final de MgCl₂ para la PCR anidada, la reacción se probó a 2,0 mM y a 2,5 mM. Las bandas obtenidas presentaron las mismas características a ambas concentraciones por lo que se optó por utilizar la menor de ellas a diferencia del trabajo de Sánchez Seco *et al.* (9), donde se utilizó 2,5 mM.

El límite de detección obtenido para la RT-PCR anidada fue de 0,47 UFP/mL, (5,36.10⁻³ UFP/reacción) que resulta menor al obtenido por otros autores, como Sánchez Seco *et al.* (9) con un valor de 25 UFP/tubo para una RT-PCR anidada, y Pfeffer *et al.* con una sensibilidad 1,2 UFP/mL para una RT-PCR semi anidada (10); ambos trabajos también para detección genérica de alfavirus. Este resultado indica que la técnica podría ser capaz de detectar cargas virales muy bajas en una variedad de muestras humanas y animales y además, en el estudio de sus vectores mosquitos (2, 10, 12).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- King A, Adams M, Carsten E, Lefkowitz E. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Inc; 2012.
- Mahalingam S, Herrero L. Alphavirus: Current Biology. Ilustrada. Florida: Caister Academic Press; 2016.
- Kuno G, Chang G. Biological transmission of arboviruses: Reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. *Clinical Microbiology Reviews*. 2005; 18: 608–37.
- Weaver S, Reisen W. Present and future of arboviral threats. *Antiviral Res*. 2010; 85(2):328–45.
- Mahan D, Howley P, Virology F, Griffin DE, Aura A, Morgan F. Fields Virology Alphaviruses Fields Virology encephalitis. Lippincott Williams & Wilkins 2012.
- Epidemiol S, Bolet E, Internacional RS. Boletín; 2014.
- Belkin J, Schick R, Heinemann S. Mosquito studies (Diptera, Culicidae) XI. Mosquitoes originally described from Argentina, Bolivia, Chile, Paraguay, Peru, and Uruguay. *Am Entomol Inst*. 1968; 17(4): 9-29.
- Narosky T, Yzurieta D. Guía de identificación de aves de Paraguay. Buenos Aires: Vazquez Mazzini; 2006.
- Sánchez M, Rosario D, Quiroz E, Guzmán G, Tenorio A. A generic nested-RT-PCR followed by sequencing for detection and identification of members of the alphavirus genus. *J Virol Methods*. 2001; 95 (1–2):153–61.
- Pfeffer M, Wiedmann M, Batt C. Applications of DNA amplification techniques in veterinary diagnostics. *Veterinary Research Communications* 1995; 19: 375–407.
- Grywna K, Kupfer B, Panning M, Drexler J, Emmerich P, Drosten C. Detection of all species of the genus Alphavirus by reverse transcription-PCR with diagnostic sensitivity. *J Clin Microbiol*. 2010; 48(9):3386–7.
- Thermo Scientific. Thermo Scientific Revert Aid H Minus Reverse Transcriptase. Thermo Fisher Scientific. 2000; (3):3–6.
- Sanguinetti C, Neto E, Simpson A. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*. 1994; 17 (5):914-21.
- Delfraro A, Burgueño A, Morel N, Gonzalez G, Garcia A, Morelli J, *et al.* Fatal human case of western

equine encephalitis, Uruguay. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 952-4.

15. Jones E, Patel N, Levy A, Storeygard A, Balk D, Gittleman J. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*. 2008; 451(7181): 990-3.

16. Zacks M, Paessler S. Encephalitic alphaviruses. *Veterinary Microbiology*. 2010; 140: 281-6.

17. Pfeffer M, Dobler G. Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration. *Parasit Vectors*. 2010; 3(1):35.