

Virología molecular en México: Implementación del diagnóstico molecular del SARS-Coronavirus

Palabras clave: Síndrome respiratorio agudo severo, coronavirus, diagnóstico molecular, virología molecular, reacción en cadena de la polimerasa, PCR, SARS.

Key words: Severe acute respiratory syndrome, coronavirus, molecular diagnosis, molecular virology, polymerase chain reaction, PCR, SARS,

Recibido: 21/06/2006
Aceptado: 03/07/2006

Claudia Charles-Niño,* María de Lourdes Garza-Rodríguez,*
Javier Ramos-Jiménez,* Ana María Rivas-Estilla*

* Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UANL.

Correspondencia:

Dra. Ana María Rivas Estilla

Av. Madero y Eduardo Aguirre Pequeño s/n.

Mitras Centro, 64460 Monterrey, N.L., México.

Tel: (81) 8329-4174. Fax: (81) 8333-7747

E-mail: amrivas1@yahoo.ca

146

Resumen

El síndrome respiratorio agudo severo (SARS) es una enfermedad infecciosa emergente causada por el SARS-Coronavirus (SARS-CoV). Una de las técnicas más específicas y sensibles para el diagnóstico virológico es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se ha reportado que mediante PCR se puede detectar el virus directamente de muestras de pacientes durante la primera semana de hospitalización. En este trabajo nos propusimos estandarizar e implementar una prueba de diagnóstico molecular para el SARS-CoV en nuestra región. La síntesis de ADNc se realizó a partir de ARN del SARS-CoV donado por el Instituto de Medicina Tropical de la Universidad de Frankfurt, Alemania, y simultáneamente se amplificó una secuencia del virus mediante PCR. Después se realizó una segunda amplificación para aumentar la sensibilidad y especificidad. Los productos amplificados fueron detectados mediante electroforesis y tinción con bromuro de etidio. Variando las condiciones de amplificación (concentración de iniciadores, ciclos de amplificación y temperaturas de alineamiento), se lograron amplificar de manera reproducible dos fragmentos de ADN del tamaño esperado (195 y 110 pb). Con estos resultados podemos mencionar que la aplicación de pruebas moleculares permite una identificación rápida, sensible y específica del SARS-CoV en pacientes sospechosos en nuestra región.

Abstract

The etiological agent of SARS, an emerging infectious disease, is the coronavirus named SARS-CoV. Rapid diagnostic test are very important for case recognition and management of infected people. Because the Polymerase Chain Reaction (PCR) has a high sensitivity and specificity it has been used as a viral diagnosis tool. Several reports demonstrate SARS-CoV detection by PCR from patients during the first week of hospitalization. The major aim of this work was to standardize and set up in our region the molecular diagnosis of this virus. We performed a cDNA synthesis from SARS CoV-RNA (kindly donated by Bernhard Notch Tropical Institute Hamburg, Germany) and simultaneously we amplified by PCR a fragment of 195 bp in a single tube. In order to increase sensitivity and specificity we performed a Nested PCR to amplify a second DNA fragment. Both PCR products were detected by electrophoresis and ethidium bromide staining. Variation in amplification parameters such as, primers concentration, amplification cycles and annealing temperature, we amplified two reproducible fragments of 195 and 110 bp. Based in our results, now we can apply molecular assays, as PCR, in order to perform a highly sensitive and specific molecular diagnosis of SARS-CoV in suspected patients in our region.

Introducción

Las nuevas plataformas tecnológicas desarrolladas en el área de la biomedicina, así como los avances en medicina genómica, internet y bancos genéticos, nos permiten hoy en día aislar microorganismos, secuenciar sus genomas, analizarlos, compararlos con otros previamente aislados e identificarlos en tan sólo unos días. Aprovechando esta generación de conocimientos, la virología moderna nos permite identificar agentes virales causantes de enfermedades emergentes en periodos relativamente cortos.

De esta manera logró aislarse el agente etiológico causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) a principios de 2003. El SARS es una enfermedad infecciosa emergente de la cual actualmente se han registrado 8,096 casos a nivel mundial, con 774 defunciones.^{1,2} El SARS se identificó por primera vez en Guangdong, provincia de China, en noviembre de 2002,³ en donde se reportaron 305 casos de neumonía atípica severa altamente contagiosa.⁴ La infección se transmitía de persona a persona. A estos casos siguieron reportes de Vietnam, Canadá y Hong Kong. A principios de 2003 existían ya más de 2,353 personas infectadas en el mundo, de los cuales 4% había muerto.²⁻⁶ En respuesta al gran número de casos y debido al temor de que la enfermedad se convirtiera en una amenaza mundial, la Organización Mundial de la Salud (OMS) en coordinación con diferentes laboratorios del mundo se dieron a la tarea de identificar el agente etiológico de esta enfermedad. El virus causante del SARS se aisló por primera vez en abril de 2003 y se identificó como un virus de ARN al que se le llamó SARS-Coronavirus (SARS-CoV).^{1,7} Este virus fue clasificado dentro de la familia *Coronaviridae*, en la cual se encuentran otros virus causantes de enfermedades respiratorias y gastrointestinales como: 22E, NL-63, OC43 y HKU1.^{1,8}

Después de la identificación del SARS-CoV se iniciaron las investigaciones para establecer prue-

bas diagnósticas rápidas y sensibles que permitieran la identificación de los pacientes infectados lo antes posible.^{1,9,10}

Los casos clínicos de pacientes con SARS presentaban fiebre y neumonía, signos que no permiten diferenciar esta infección fácilmente de otras neumonías atípicas. Es por esto que el diagnóstico confirmatorio mediante pruebas específicas cobró suma importancia en sujetos infectados. En la actualidad, las muestras biológicas utilizadas para el diagnóstico son de esputo, exudados faríngeos o suero de pacientes con signos y síntomas sugestivos de SARS.

Entre las primeras pruebas que fueron estandarizadas se encuentran la detección de anticuerpos específicos contra el SARS-CoV. Uno de los inconvenientes para lograr una identificación rápida del SARS-CoV mediante este examen inmunológico es el tiempo requerido para la generación de la respuesta inmune (alrededor de 10 días).^{10,11} También se logró cultivar el virus; sin embargo, su utilización no es una herramienta práctica para el diagnóstico oportuno de esta enfermedad.^{4,11} Otras de las pruebas que se estandarizaron fueron los ensayos moleculares, mediante los cuales se amplifican secuencias específicas del genoma viral por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los iniciadores utilizados en la PCR fueron obtenidos a partir de secuencias consenso de otros coronavirus ya conocidos, además de analizar las muestras con iniciadores para otros virus causantes de neumonías e influenza.^{12,13} La técnica de RT-PCR resultó ser una prueba rápida y sensible para detectar la infección producida por el SARS-CoV en estadios tempranos de la infección. Esta prueba permite la identificación del virus directamente de muestras de pacientes como esputo, exudados faríngeos, suero o plasma desde la primera semana de hospitalización. Además se obtienen resultados en 24 a 48 horas y a un bajo costo. La OMS ha publicado los métodos de laboratorio para el diagnóstico de SARS validados inter-

nacionalmente y como método principal se menciona la identificación del virus mediante PCR.

Debido a la amenaza de esta infección a nivel mundial y que en nuestra región no se cuenta actualmente con un laboratorio especializado en la identificación molecular de agentes infecciosos asociados a enfermedades emergentes, en este trabajo nos propusimos estandarizar e implementar una prueba de diagnóstico oportuno, rápida, sensible y específica para el SARS-CoV.

Material y métodos

Obtención de la muestra. Para implementar y estandarizar el diagnóstico molecular de este virus nos pusimos en contacto con organismos internacionales como la OMS y el Instituto de Medicina Tropical Bernhard Nocht para obtener el material genético del SARS-CoV y la secuencia de los iniciadores específicos para amplificar el genoma viral, ya que en nuestro país no se ha reportado oficialmente ningún caso de SARS. La OMS recomienda que para validar las muestras positivas todas deberán procesarse por duplicado. En el caso de pacientes, se recomienda tomar dos o más tipos de muestras o bien del mismo tipo tomadas en días diferentes, además de incluir en todos los análisis controles negativos para detectar contaminación cruzada entre muestras. En nuestro caso, las muestras utilizadas fueron de ARN viral del SARS-CoV proporcionadas por el Instituto para Medicina Tropical de la Universidad de Frankfurt, Alemania, el cual pertenece a la red de laboratorios para diagnóstico del SARS avalados por la OMS.

Extracción del ARN viral. Según las indicaciones de la OMS, la muestra biológica debe mezclarse vigorosamente con N-acetil-L-cisteína en volúmenes iguales y 0.9% de cloruro de sodio. Este proceso se lleva a cabo siempre bajo condiciones estériles y libres de ARNsas en un área con nivel de bioseguridad nivel 3 dedicada exclusivamente para la extracción de ARN y utili-

zando sólo material preparado para extracción de ARN.¹⁴

El proceso de extracción de ARN de pacientes infectados con el SARS-CoV se realizó en los laboratorios Alemanes. Alícuotas de ARN viral fueron enviadas a nuestro laboratorio (muestras no infecciosas), en donde se manejaron siguiendo normas de bioseguridad nivel 2, utilizando una cabina de bioseguridad tipo A II para uso exclusivo de material potencialmente infeccioso. Las muestras de ARN viral del SARS-CoV se mantuvieron a -70 °C hasta su proceso.

Amplificación del genoma viral. Para la identificación del genoma viral del virus del SARS-CoV se realizó la síntesis de ADN complementarios (ADNc). La amplificación del genoma viral se llevó a cabo utilizando iniciadores que amplifican una región del genoma del virus del SARS.¹⁵ Se efectuó la retrotranscripción y primera amplificación en un solo paso (RT-PCR). Posteriormente, para aumentar la sensibilidad en la detección y para confirmar que la secuencia amplificada era específica del SARS-CoV, se realizó una segunda amplificación (PCR anidada).

RT-PCR y PCR anidada. En la reacción de RT-PCR se utilizaron los iniciadores BNIoutS2, BNIoutAs, BNIinS, BNIinS (*cuadro I*), los cuales amplifican un segmento de la región ab del ORF 1 (gen pol B). Las muestras se prepararon agregando 2 µL ARN y 5.5 µL de agua DEPC, se incubaron durante 10 minutos a 70 °C y 10 minutos en hielo. La reacción de RT-PCR se llevó a cabo en un solo paso, se agregaron dNTP's 0.2 mM, sul-

Cuadro I. Iniciadores oligonucleotídicos utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y PCR anidada.

Iniciador	Secuencia
BNIoutS2 (exterior)	ATG AAT TAC CAA GTC AAT GGT TAC
BNIoutAs (exterior)	CAT AAC CAG TCG GTA CAG CTA C
BNIinS (interior)	GAA GCT ATT CGT CAC GTT CG
BNIinS (interior)	CTG TAG AAA ATC CTA GCT GGA G

fato de magnesio 5 mM, primer BNloutS2 0.5 μ M, primer BNloutAs 0.5 μ M, mezcla de enzimas RT/Taq 0.4 μ L, en un volumen total de 20 μ L. Se probaron distintas temperaturas de alineamiento y extensión. Finalmente las condiciones establecidas fueron: 30 minutos a 45 °C, tres minutos a 95 °C, 10 ciclos (10 segundos a 95 °C, 10 segundos a 60 °C, 20 segundos a 72 °C), 40 ciclos (10 segundos a 95 °C, 10 segundos a 56 °C, 20 segundos a 72 °C) y un paso final de cinco minutos a 72 °C. Al final de la amplificación, el fragmento amplificado fue de 195 pb.

La mezcla de reacción del Nested PCR contenía 2 μ L del producto amplificado, dNTP's 0.2 mM, cloruro de magnesio 2.5 mM, primer BNlinS 0.5 μ M primer BNlinAs 0.5 μ M, 1 U de Taq Platinum, en un volumen total de 50 μ L. Las condiciones para la amplificación, también variando la temperatura de alineamiento fueron tres minutos a 95 °C, 10 ciclos (10 segundos a 95 °C, 10 segundos a 60 °C y 20 segundos a 72 °C), 25 ciclos (10 segundos a 95 °C, 10 segundos a 56 °C, 20 segundos a 72 °C) y un paso final de cinco minutos a 72 °C. El fragmento amplificado fue de 110 pb.

La visualización del producto amplificado se realizó mediante análisis electroforético, en un gel de agarosa al 2% en buffer TBE 1X y teñido con bromuro de etidio. Las imágenes fueron capturadas en un fotodocumentador UVP GSD 8000 con el software LabWorks Ver 4.5.

Resultados

Los iniciadores utilizados para la identificación del SARS-CoV amplificaron los fragmentos de ADN del tamaño esperado (195 y 110 pb). Las bandas de los productos amplificados de la PCR se obtuvieron después de varias modificaciones en temperaturas de alineamiento. Los fragmentos amplificados del virus se detectaron de manera reproducible como una banda de 195 pares de bases como producto de la primera amplificación y una banda de 110 pares de bases en la segunda

amplificación (*figura 1*). El experimento se repitió tres veces, obteniéndose los mismos resultados en todos los ensayos. El tiempo en el que se realizaron las amplificaciones con PCR y la detección de los fragmentos amplificados fue de 10 horas.

Discusión

El diagnóstico de las enfermedades respiratorias agudas que se realiza en la actualidad en los centros regionales de diagnóstico se basa principalmente en la utilización de pruebas bacteriológicas, en las cuales el resultado tiende a tardar alrededor de cinco días y no es certero en muchos de los casos. Actualmente las pruebas de diagnóstico molecular son altamente sensibles y permiten la identificación de bacterias, hongos y virus con una alta sensibilidad, especificidad y ra-

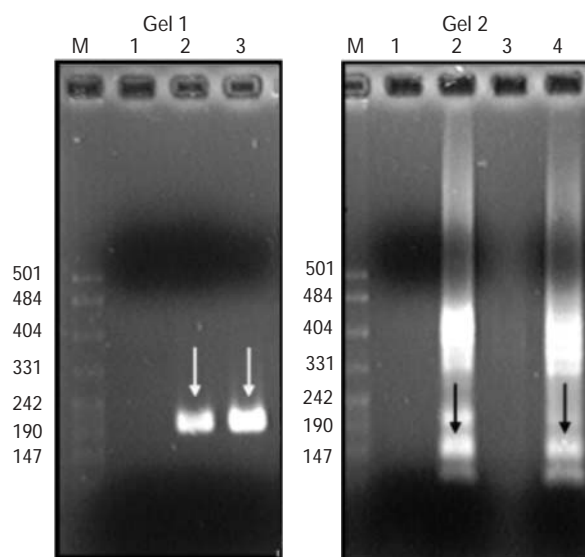


Figura 1. Geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio. En el gel 1 se observan los resultados de la RT-PCR en donde se obtuvo un fragmento de 195 pb, se observa el marcador de peso molecular (M), el control negativo (carril 1) y los controles positivos en los carriles 2 y 3. En el gel 2 se observan los resultados de la PCR anidada, se obtuvo un fragmento de 110 pb; se observa el marcador (M) en los carriles 2 y 4 los controles positivos, así como los controles negativos en los carriles 1 y 3.

pidez. Además, utilizando las técnicas de PCR, pueden detectarse los genomas de prácticamente cualquier microorganismo del cual se conozca la secuencia de su material genético.

En este trabajo se estableció el diagnóstico molecular para el virus SARS-CoV por medio de la RT-PCR anidada en nuestro laboratorio. El ensayo es rápido, altamente sensible y puede realizarse en menos de 48 horas. Comparado con la PCR tradicional, la PCR anidada nos permitió aumentar la sensibilidad y especificidad del estudio, lo que nos posibilitará analizar muestras con baja carga viral. Esta metodología permite además analizar cualquier tipo de muestras biológicas de pacientes infectados. No se obtuvieron falsos positivos y los controles negativos no presentaron bandas de amplificación, con lo que aseguramos no tener contaminación cruzada entre muestras.

La OMS recomienda que este tipo de pruebas sea realizado en laboratorios con amplia experiencia en diagnóstico molecular, que sigan las normas de bioseguridad apropiadas (nivel 2 y 3), que tengan criterio para manejar este tipo de muestras y que realicen las pruebas con alta calidad. Nuestro laboratorio cuenta con amplia experiencia en pruebas de diagnóstico molecular de agentes infecciosos, entre los que se encuentran el VIH-1, virus de la hepatitis C, citomegalovirus, virus del Oeste del Nilo, entre otros. Además, contamos con infraestructura que nos permite manejar muestras altamente infecciosas con nivel de bioseguridad que protege al personal y al medio ambiente.

Conclusiones

Con estos resultados podemos mencionar que a partir de mayo de 2004, la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) cuenta con las pruebas moleculares necesarias para detectar la secuencia genética del SARS-CoV en pacientes sospechosos. Este tipo de pruebas permitirá identificar de manera mucho más certera y oportuna

cualquier posible caso de infección en nuestro país, lo que disminuirá el número de contagios. Además, es importante mencionar que este tipo de pruebas moleculares facilitará a los médicos del país el diagnóstico y tratamiento de pacientes sospechosos de padecer estas enfermedades emergentes. Se debe resaltar la necesidad de establecer este tipo de estudios moleculares que permitirían afrontar una emergencia epidemiológica como el SARS u otros virus emergentes.

Referencias

1. Weiss SR, Navas-Martin S. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiol Molec Biol Rev* 2005; 635-664
2. World Health Organization. Cumulative number of reported cases (SARS) from 1 February to 27 March 2003. <http://www.who.int/csr/>
3. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003; 348: 1953-1966.
4. Keyaerts E, Vijgen L, Maes P, Duson G, Neyts J, Van Ranst M. Viral load quantitation of SARS-coronavirus RNA using a one-step real-time RT-PCR. *Int J Infect Dis* 2006; 10 (1): 32-37.
5. Franco-Paredes C et al. Síndrome agudo respiratorio severo: un panorama mundial de la epidemia. *Sal Pub Mex* 2003; 45 (3): 211-220.
6. Lee N et al. A Major Outbreak of Severe Acute Respiratory Syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med* 2003; 348: 20.
7. Holmes KV. SARS-associated coronavirus. *N Engl J Med* 2003; 348: 20.
8. Marra MA, Jones SJ, Astell CR et al. The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science* 2003; 300: 1399-1404.
9. Niedrig MA, Leitmeyer KA, Limc W, Peiris M, Mackenzie, Zambonf JSM. First external quality assurance of antibody diagnostic for SARS-new coronavirus. *J Clin Virol* 2005; 34: 22-25.
10. Jung Liu et al. Immunofluorescence assay for detection of the nucleocapsid antigen of the severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus in cells derived from throat wash samples of patients with SARS. *J Clin Microbiol* 2005; 43 (5): 2444-2448.
11. Tsang KW, Ho PL, Ooi GC et al. A cluster of cases of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med* 2003; 348: 1977-1985.
12. Drosten C, Gunther S, Preiser W et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003; 348: 1967-1976.
13. Lau SKP et al. SARS coronavirus detection methods. *Emerg Infect Dis* 2005; 11 (7): 1108-1111.
14. Manual de procedimientos para el diagnóstico de laboratorio de las infecciones respiratorias agudas de etiología viral. OMS. http://www.paho.org/spanish/ad/ths/ev/labs_IPK.pdf
15. <http://www.bni.uni-hamburg.de/>