

Diagnóstico de virus por amplificación específica y detección no radioactiva

Sobrinó, F., Escribano, J. M. y Coll, J. M.

Departamento de Sanidad Animal, INIA, CRIDA 06, Embajadores 68, 28012 Madrid

La capacidad de amplificar específicamente hasta un millón de veces las secuencias genómicas de virus en presencia de un exceso de ácidos nucleicos del hospedador, ilustra el potencial de las reacciones catalizadas por las polimerasas termoestables de los ácidos nucleicos. El acoplamiento de estas técnicas de amplificación con los métodos de detección no radioactiva, puede revolucionar los métodos actuales de detección de virus, tanto en el diagnóstico clínico humano, como en el veterinario. Estos nuevos métodos, unidos al uso de sondas universales marcadas, pueden permitir la estandarización de reactivos comunes para muchos virus.

Planteamiento clínico

Amplificación específica

Uno de los mayores problemas en las enfermedades víricas es la detección de portadores asintomáticos. Generalmente su identificación se basa en métodos indirectos de presencia de anticuerpos, pero no en el aislamiento del virus. Para intentar definir el desafío tecnológico que ello implica, un portador mínimo, teóricamente, tendría un virus infeccioso por órgano diana, lo que puede suponer 1 virus/g ó 1 virus/kg de tejido sano. Los límites de detección de virus de las técnicas actuales (cultivos celulares, ELISAS con anticuerpos monoclonales y sondas de DNA), no llegan a estos niveles.

Por otra parte, no todo el órgano afectado puede utilizarse para el muestreo y normalmente se utilizan mezclas de órganos procedentes de varios individuos sanos y afectados para hacer los análisis. Además, pueden haberse formado inmunocomplejos, circunstancias frecuentes en infecciones subagudas o crónicas. Todo ello disminuye la sensibilidad de los métodos convencionales de detección viral.

Los protocolos originales de amplificación de DNA utilizaban la DNA polimerasa I de *E. coli* (fragmento Klenow). Sin embargo, su uso quedaba limitado, bien por la necesidad de añadir nueva enzima cada vez que se calentaba para separar las nuevas cadenas del DNA sintetizado o bien, por que se amplificaba además del fragmento específico, otros no específicos. El uso de la bacteria *Thermus aquaticus* y de los oligonucleótidos sintéticos primers, permite resolver ambos problemas.

El tamaño de secuencia amplificada queda definido por la distancia entre los dos primers y puede ser de hasta un máximo de 2,5 kb, aunque es preferible usar unas 400 b (1). La especificidad de la amplificación se basa en el uso de 2 oligonucleótidos que flanquean el segmento a amplificar y que hibridan cada uno con una cadena del anti-DNA a amplificar. El tamaño medio de los oligonucleótidos es de unas 20 b y su hibridación ha de ser estable a 70°C (temperatura óptima de la polimerasa).

El procedimiento implica una desnaturalización del DNA de doble cadena por calentamiento a 90°C, hibridación de los primers a 40-70°C y extensión de estos con la polimerasa. Los primers se orientan para que la síntesis ocurra en la región de DNA existente entre ellos. Los productos de la extensión de un primer sirven de molde para el otro primer, de tal manera que cada ciclo duplica la cantidad de los productos específicos. Ello resulta en la acumulación exponencial de la secuencia específica aproximadamente 2ⁿ, donde n es el número de ciclos. Los límites de estos fragmentos están definidos por los extremos 5' de los primers que quedan hibridados a ellos.

La acumulación exponencial de los productos amplificados no es limitada. Después de unos 40 ciclos, se acumula una cantidad tal de primer-molde que la enzima inicialmente añadida no puede copiar en el tiempo de la reacción. En ese momento la cantidad de producto se acumula de una manera lineal en vez de exponencial. Por otra parte, aumentando la cantidad de enzima y/o el tiempo de reacción se disminuye la

especificidad. Además, la cantidad de producto acumulado es tan grande que puede rehibridar y hace inútil la presencia de la enzima. Todo ello contribuye a que aparezca un *plateau* en la reacción.

La fidelidad de la amplificación se ha demostrado por clonaje y secuenciación de productos de amplificación aislados (frecuencia de error: 2×10^{-4} por nucleótido por ciclo). La amplificación y detección de una copia de DNA-diana de 2 kb en 10 μ g de DNA (1.5×10^6 células diploides), es posible (1, 2). La amplificación de RNA puede ser obtenida después de su conversión a DNA con los *primers* convenientes y transcriptasa reversa; el cDNA resultante puede ser directamente amplificado por la polimerasa *Taq*.

Para detectar las secuencias específicas de los virus se pueden utilizar dos pasos: amplificación con polimerasa *Taq* del ácido nucleico viral ó sondas específicas. El orden de estos pasos se está investigando actualmente (Fig 1). Para detectar las secuencias específicas de los virus amplificadas ó no, se puede utilizar

una primera sonda consistente en un plásmido recombinante linearizado que contenga insertos complementarios al genoma del virus (sonda específica). Después, la presencia de secuencias de la sonda específica se puede detectar con secuencias complementarias del mismo plásmido marcado (segunda sonda universal). La ventaja de este método estriba en que se pueden realizar un gran número de hibridaciones con diferentes sondas específicas marcando solamente una misma sonda inespecífica que actuaría como revelador universal (3). La amplificación de las secuencias con la polimerasa *Taq* puede hacerse, bien de las secuencias del virus (se necesitan dos *primers* que definan la secuencia diana a amplificar), o bien de las secuencias del plásmido utilizado como sonda (los *primers* son conocidos).

Detección no radioactiva

Una vez identificado el segmento de DNA utilizable como sonda, se produce en grandes cantidades mediante su introducción en una bacte-

ria (4), o bien mediante síntesis de polinucleótidos. Después viene el problema de marcarlo para su detección (5) y más tarde conseguir un protocolo sencillo para que esta tecnología pueda manejarse por personal poco entrenado y en laboratorios sencillos (6).

En los laboratorios de investigación, en general, las sondas de DNA están marcadas con isótopos radioactivos. Para su detección se utiliza la exposición a películas fotográficas o contadores radioactivos. Más recientemente sin embargo se está abandonando este método debido a la corta vida media de las sondas, la necesidad de instrumental complejo y costoso y el problema de los desechos radioactivos. Las nuevas estrategias incluyen el empleo de marcadores enzimáticos o fluorescentes.

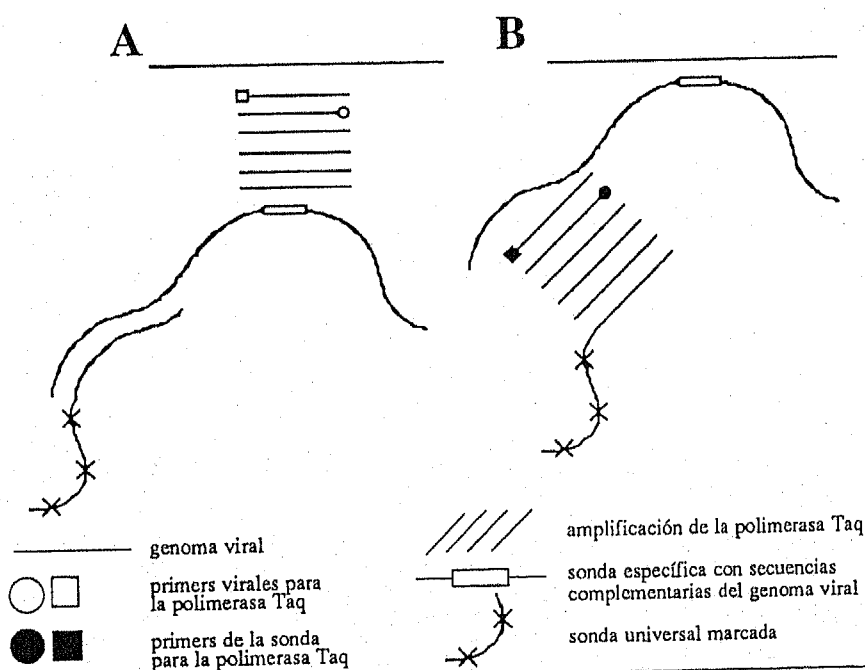
Las simplificaciones técnicas que harían posible el desarrollo de estas pruebas a escala de *kit* de diagnóstico, están todavía en fase de desarrollo. Los principales puntos son:

- Puesta a punto de un método sencillo y rápido de tratamiento de muestras, es decir de convertir las muestras en DNA ó RNA de cadena sencilla y a la concentración adecuada.
- Puesta a punto de un método no radioactivo para detección de la sonda una vez hibridizada (biotinilación).
- Obtención de la sonda.
- Desarrollo de un *kit* de diagnóstico.

La biotinilación de las sondas de DNA es quizás el mejor método actual de marcaje no radioactivo. La biotinilación se lleva a cabo por sustitución de los nucleótidos de timidina por derivados biotinilados. La incorporación del derivado biotinilado a cadenas nacientes de DNA ó RNA es semejante a las del resto de los nucleótidos.

El porcentaje de sustitución afecta entre el 40% y el 70% de las timidinas y no interfiere con la cinética de hibridación. La sonda biotinilada e hibridada a su secuencia complementaria se detecta con proteínas ligadoras de la biotina marcadas con enzi-

Fig. 1 Esquema de dos alternativas posibles de amplificación del genoma viral (A) ó de la sonda específica (B) y de su detección con sondas universales marcadas



mas (avidina ó estreptavidina marcadas con peroxidasa o fosfatasa alcalina). La presencia de estas enzimas se revela con sustratos cuyo producto es insoluble. La utilización de dos sondas marcadas con distintas enzimas permite la detección de dos secuencias en un único experimento. El DNA biotinilado, en contraste con el marcado con ^{32}P es estable durante unos 2 años. Aunque la sensibilidad de estos métodos no radioactivos de detección incrementan la sensibilidad (1, 2).

Conclusiones

La alta especificidad de la hibridación de *primers* y elongación con la polimerasa *Taq* es capaz de generar fragmentos únicos a partir de DNA ó RNA comparables a los fragmentos

preparados mediante clonaje. Los productos de la amplificación pueden usarse como sustratos para una gran variedad de procedimientos analíticos ó como sondas específicas.

Debido a la acumulación exponencial de las copias procedentes de una secuencia progenitora única, la amplificación basada en la DNA polimerasa *Taq* representa una forma de clonaje *in vitro* que puede realizar en 1 hora lo que de otra manera tardaría semanas de crecimiento biológico y de purificación bioquímica.

En el diagnóstico de secuencias virales, la amplificación mediada por la polimerasa *Taq* se ha usado para la detección de los virus asociados al SIDA (8) y al cáncer cervical (9) a escala de laboratorio, utilizando sondas marcadas radioactivamente. ■

Referencias

- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A.. Science, **239**: 487-491 (1988).
- Erlinch, H. Ed. Stockton Press, 176 pag. (1989).
- Pareja, E. Congreso Nacional de la SEI. Granada, 12-15 de octubre (1988).
- Escribano, J. M. y Alonso, C. Comunicaciones INIA, **8**: 1-25 (1984).
- Tabares, E. Arch. Virol. **92**: 233-242 (1987).
- Coll, J. Med. Vet, **5**: 263-274 (1988).
- Erlich, H. A., Gelfand, D. H. and Saiki, R. K. Nature **331**: 461-462 (1988).
- Ou, C.Y. et al. Science **239**: 295-297 (1988).
- Shibata, D. Martin, W. J. and Arnheim, N. J. J. Exp. Med. **167**: 225-230 (1988).

Discusión sobre una nueva Directiva Comunitaria: Protección legal de las invenciones biotecnológicas

Carmen Toledo de la Torre y Manuel Illescas Taboada

Registro de la Propiedad Industrial, M^º de Industria y Energía, P^º Castellana 160, 28046 Madrid

Los pasados 17 y 18 de enero, bajo la presidencia española de la CEE, se empezó a discutir en el Consejo una propuesta de directiva elaborada por la Comisión y cuyo objeto es establecer una protección a través de patentes de las invenciones biotecnológicas, invenciones que por sus características peculiares, en ciertos casos no han sido patentables hasta el momento en los países comunitarios.

La delegación española está formada por juristas expertos en Propiedad Industrial y dos biólogos y una farmacéutica como asesores técnicos en este sector, con el apoyo técnico del M^º de Agricultura, a través

del Instituto de Semillas, para el asesoramiento en el controvertido problema de la patentabilidad de las variedades vegetales. La presidencia del grupo de trabajo recae en el Profesor Alberto Bercovitz.

Se han llevado a cabo ya tres sesiones del grupo, restando aún dos bajo la presidencia española. Hasta ahora el ritmo de los trabajos ha sido muy intenso por lo que no podría descartarse la posibilidad de que la discusión quedase cerrada durante la próxima presidencia francesa. Este ritmo viene motivado, fundamentalmente, por el apoyo que están brindando las delegaciones alemana e

inglesa fundamentalmente.

La propuesta de directiva está formada por 21 artículos y subdividida en 6 capítulos:

- I) Patentabilidad de la materia viva
 - Invenciones patentables (art. 3).
 - Usos y procedimientos patentables (art. 4).
 - Procedimientos microbiológicos (art. 5).
 - Procedimientos esencialmente biológicos (art. 7).
 - Material preexistente (art. 8 y art. 9).

- II) Alcance de la protección