

Estandarización de un método de detección molecular del virus influenza (H5N1) de alta patogenicidad

Standardization of a molecular detection method of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1)

► Maricela Montalvo-Corral¹, Mónica Reséndiz², Gerardo Santos-López³, Verónica Vallejo-Ruiz⁴, Julio Reyes-Leyva⁵, Jesús Hernández⁶

1. Maestra en Ciencias. Especialidad en Epidemiología Molecular. Estudiante de Posgrado. Laboratorio de Inmunología. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Sonora, México
2. Químico Biólogo. Asistente de Investigación, Laboratorio de Inmunología. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Sonora, México
3. Doctor en Ciencias. Especialidad en Virología. Investigador Asociado. Centro de Investigación Biomédica de Oriente, IMSS
4. Doctora en Ciencias. Especialidad en Biología Molecular. Investigador Asociado. Centro de Investigación Biomédica de Oriente, IMSS
5. Doctor en Ciencias. Jefe de Laboratorio Biología Molecular y Virología. Centro de Investigación Biomédica de Oriente, IMSS
6. Doctor en Ciencias. Investigador Titular. Laboratorio de Inmunología, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Sonora, México

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

Resumen

El virus de la influenza aviar H5N1 de alta patogenicidad mantiene el alerta mundial debido a su potencial zoonótico y pandémico. Surge entonces la necesidad de contar con herramientas para la detección temprana y de esta forma reducir el impacto potencial a la salud humana y animal. En este estudio se estandarizó un método de detección molecular de los genes de la matriz (M), hemaglutinina (H5) y neuraminidasa (N1) del virus de la influenza aviar H5N1 de alta patogenicidad de linaje asiático, mediante transcripción-reversa y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RRT-PCR). A partir de un ARN viral de referencia cepa A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) se construyeron controles positivos mediante clonación de productos de PCR. Los estándares de naturaleza plasmídica se emplearon en la obtención de curvas estándar para determinar los límites de detección de la técnica. La sensibilidad observada para todos los genes analizados fue de 10^2 copias de ADN/ μ L. Las curvas mostraron una eficiencia superior al 90%, y $R^2 > 0,99$. Este método puede ser útil en las campañas de monitoreo del virus en aves migratorias, así como para el tamizaje de muestras clínicas de humanos, en una emergencia de salud.

Palabras clave: influenza aviar * detección * transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Summary

Highly pathogenic avian influenza virus (HPAI) H5N1 is a global threat due to its zoonotic and pandemic potential. Then, concern arises and the need to have early detection tools to minimize the impact on human and animal health. In this work, a molecular detection method was implemented to detect matrix (M), hemagglutinin (H5) and neuraminidase (N1) genes of HPAI avian influenza virus H5N1, based on real time RT-PCR (RRT-PCR). Positive controls were constructed from reference RNA viral A/Vietnam/1203/2004 (H5N1),

cloned into plasmidic vectors and sequenced. Assay detection sensitivity was assessed with standard curves for each gene. Assay sensitivity was 10² DNA copies/ μ l in all cases. Curves showed amplification efficiency higher than 90% and R²>0.99. This method could be useful for bird monitoring campaigns and as a screening procedure for clinical samples.

Key words: *avian influenza * detection * real time reverse transcription-polymerase chain reaction*

Introducción

El virus de la influenza aviar H5N1 de alta patogenicidad representa un riesgo serio para la salud mundial debido a su potencial zoonótico y pandémico. La influenza aviar ocasionada por este subtipo surgió como una enfermedad en animales, sin embargo, cuando aparecieron los primeros casos en humanos en el brote ocurrido en Hong Kong en 1997 se convirtió en un problema de salud pública (1-4). A la fecha se han confirmado más de 380 casos, con una mortalidad superior al 60% (4). Adicionalmente, los brotes de influenza aviar ocasionaron severas pérdidas económicas para la industria avícola en diversos países de Asia, Europa y África.

Los virus influenza A están ampliamente distribuidos en su reservorio natural que son las aves acuáticas migratorias y pueden ser transmitidos a nuevos hospederos incluyendo el humano (5). Las aves acuáticas, particularmente de los órdenes Anseriformes y Charadriiformes, tienen un papel fundamental en la biología y propagación de estos virus en la naturaleza (6). Diversas cepas del virus influenza aviar H5N1 de alta patogenicidad (IAAP) circulan entre la población de aves domésticas y silvestres en Asia. Estos virus han sufrido rápidos cambios genéticos desde su aparición (7-10) lo cual ha incrementado su adaptación al ser humano facilitando el proceso de transmisión de persona a persona.

La diseminación rápida de estos virus ha hecho necesario mejorar las medidas de bioseguridad en sitios con brotes, y establecer sistemas de vigilancia en aves potencialmente infectadas. También se ha buscado desarrollar métodos de detección temprana que sean cada vez más confiables. Los métodos tradicionales de detección, como el aislamiento en embrión de pollo y técnicas serológicas, son aún estándares de oro para la detección del virus. Sin embargo, requieren de al menos dos semanas para la obtención de resultados, por lo que el uso de herramientas moleculares como la transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RRT-PCR), son una alternativa viable para agilizar este proceso, siendo técnicas muy eficientes, sensibles y específicas (11-13). En este trabajo se describe la estandarización de una técnica molecular para detectar el virus de la influenza H5N1 de linaje asiático, capaz de tamizar muestras clínicas de aves y humanos.

Materiales y Métodos

VIRUS

Se utilizó ARN viral de la cepa de referencia A/Vietnam/1204/2003 (H5N1) y A/Turkey/Italy/228-1279/1999 (H7N1) donado por la M. en C. Irma López (Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica, InDRE, Ciudad de México). Como control positivo para evaluar especificidad de linaje se empleó un ARN de un virus influenza subtipo H5NA de baja patogenicidad de un aislado mexicano de aves de corral.

EXTRACCIÓN DE ARN

El ARN total se extrajo manualmente usando el sistema RNeasy mini kit (Qiagen, Inc, Valencia, CA, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN fue eluido en 50 μ L de agua libre de nucleasas.

TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR)

El ADN complementario (ADNc) se sintetizó con el paquete SuperscriptTM First Strand Synthesis kit (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA, EEUU). Brevemente, se usó 1 μ L de dNTPs 10mM y 1 μ L de hexámeros (50 ng/ μ L) incubados a 65 °C por 5 min. Posteriormente se agregaron, 2 μ L de solución amortiguadora para RT 10X, 4 μ L de MgCl₂ 25 mM, 2 μ L de DTT 0,1 mM y 1 μ L de ARNasa Out (40 U/ μ L) seguido de una incubación a 42 °C por 2 min. Se añadió 1 μ L de transcriptasa reversa Superscript II (50 U/ μ L) y la mezcla se incubó a 42 °C por 50 min y 70 °C por 15 min. Finalmente se agregó 1 μ L of ARNasa H a 37 °C por 20 min. La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo empleando el sistema Brilliant QPCR Core Reagent kit (Stratagene, La Jolla, CA, EEUU). Se emplearon 2 μ L de ADNc para la amplificación en un termociclador Smart Cycler (Cepheid Inc, Sunnyvale, CA, EEUU). El volumen de reacción fue de 25 μ L que contenían: 1 μ L de mezcla de dNTP 10 mM, 2,5 μ L de MgCl₂ 25 mM, 2,5 μ L de solución amortiguadora para PCR 10X, 0,25 μ L de la enzima Sure start Taq polimerasa (5U/ μ L). Los iniciadores y las sondas de hidrólisis Taq-Man para la detección de los genes M, H5 y N1 fueron seleccionados de publicaciones previas (11) (14) y se rea-

lizó una modificación a la secuencia de sonda para H5 utilizando un *software* de acceso libre (www.idtdna.com) (5'-FAM-AAG AAA TGG AAC GTA TGA CTA CCC GCA-TAMRA-3').

Las condiciones de corrida fueron las siguientes: 50 °C por 2 min, 95 °C 10 min, 40 ciclos de 95 °C 15 s y 60 °C 1 min para el alineamiento y extensión, etapa en la que se colectaron los datos de fluorescencia emitidos por la hidrólisis de la sonda. Este protocolo se realizó alternativamente en un termociclador ABI 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU), empleando ROX como colorante de referencia. Los controles positivos (ARN viral y plásmidos con la secuencia de interés) y negativos (NTC, sin la secuencia de interés presente) fueron incluidos en todos los ensayos.

SECUENCIACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR

Los productos de PCR fueron purificados en columnas GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, LD, Reino Unido) y secuenciados en el Genomic Analysis and Technology Core, GATC (University of Arizona, Tucson, AZ, EEUU). Los análisis de secuencias fueron realizados con el *software* Chromas LITE version 2.01 (Technelysium Pty Ltd, EEUU), y los alineamientos de nucleótidos se hicieron con el algoritmo BLAST comparando con la base de datos del GenBank.

CONSTRUCCIÓN DE CURVAS ESTÁNDAR

Los productos de PCR purificados fueron clonados en el sistema pCR2.1-TOPO TA Cloning kit, (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA, EEUU). Los plásmidos con el fragmento de interés fueron propagados en bacterias *E. coli* competentes químicamente. Posteriormente fueron extraídos, cuantificados y empleados en la construcción

de curvas estándar para determinar la sensibilidad de la técnica, con diluciones por duplicado en el intervalo de 10^1 - 10^8 copias de ADN/ μ L (15).

El método de cálculo de copias de ADN/ μ L fue el siguiente:

$$\begin{aligned} \text{Peso en Daltons (g/mol)} &= (\text{tamaño en pares de bases del plásmido} + \text{tamaño en pares de bases del inserto}) (330 \text{ Da} \times 2 \text{ nucleótidos/pb}), \text{posteriormente} \\ &(\text{g/mol}) / (\text{Número de Avogadro}) = (\text{g/molécula}) = \\ &\text{Número de copias} \\ \text{Concentración del plásmido} &= (\text{g}/\mu\text{L}) / \\ &(\text{g/moléculas}) = \text{moléculas} / \mu\text{L} \end{aligned}$$

Resultados

Los resultados de las curvas estándar confirmaron la sensibilidad y especificidad del sistema de detección. Los límites de detección observados para los ensayos con los diferentes genes mostraron una alta sensibilidad dentro de un amplio intervalo de 10^2 - 10^8 copias de ADN/ μ L. Los resultados individuales fueron los siguientes: para el gen H5, se obtuvo un límite de detección de 10^2 copias de ADN/ μ L, pendiente (m) de -3,42 y coeficiente de determinación (R^2) de 0,997 (Fig. 1-A). En el ensayo de la cinética de amplificación de N1, el límite fue de 10^2 copias de ADN/ μ L, $m = -3,49$ y $R^2 = 0,998$ (Fig. 1-B). Para el gen M la sensibilidad de la técnica fue de 10^2 copias de ADN/ μ L con una $m = -3,16$ y una R^2 de 0,999 (Fig 1-C). En la figura 1D se observa una curva de amplificación típica. La eficiencia de la reacción de amplificación fue calculada con la ecuación $E = 10^{(-1/m)} - 1$ y ésta fue de 96, 93 y 107% para H5, N1 y M, respectivamente. Además de la sensibilidad, otro parámetro importante que debe evaluarse

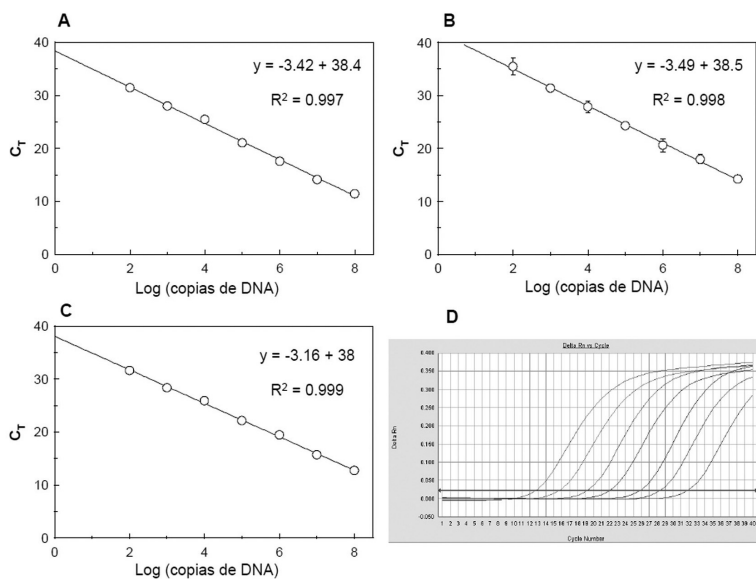


Figura 1. Regresión lineal de los puntos obtenidos en las curvas estándar empleando las diluciones decuples por duplicado del vector plasmídico con los insertos de los genes de interés. Cada punto en el eje de las x representa el número de copias de ADN/ μ L y en el eje de las y, el ciclo umbral de detección. A) curva estándar gen H5; B) gen N1; C) gen M; D) cinética de amplificación típica.

es la especificidad, por ello se empleó ARN viral de la cepa de referencia H7N1 (A/Turkey/Italy/228-1279/1999) y otro aislamiento mexicano de virus influenza aviar H5NA de baja patogenicidad. En todos ellos se observó la detección del gen de la matriz, pero ninguno fue positivo a H5 o N1 de linaje asiático.

Discusión y Conclusiones

Los resultados de estos ensayos indican que la reacción de PCR en tiempo real se efectuó dentro de los parámetros aceptables para este tipo de metodologías y que es una técnica robusta en términos de los resultados de los coeficientes de determinación obtenidos. Se observaron valores muy cercanos a los informados anteriormente por Spackman y col. (11) y Payungporn y col. (14), 10^2 copias de ARN/ μL , 10^3 y 10^2 , para M, H5 y N1, respectivamente. Sin embargo, en este estudio se realizó la evaluación de los límites de detección con el vector plasmídico. Esta estrategia puede ser empleada como una alternativa para la elaboración de curvas estándar, debido a que el uso y construcción de ARN transcritos *in vitro* es un proceso que aumenta el costo, tiempo y laboriosidad de la estandarización, considerando no obstante sus limitantes ya que se obvia la posible influencia de la eficiencia del proceso de transcripción reversa en la detección.

La aparición de enfermedades infecciosas emergentes entre la población humana, como el caso de la influenza aviar, representa un riesgo serio para la salud pública y animal. El diagnóstico temprano es una herramienta invaluable para la prevención y control de brotes. La PCR en tiempo real representa una alternativa a los métodos de diagnóstico tradicionales que puede ser aplicado a muestras clínicas y especímenes de campo. La técnica aquí descrita puede ser empleada para el monitoreo de virus influenza en aves migratorias, así como en el tamizaje de muestras clínicas presuntamente positivas al virus influenza aviar H5N1 de alta patogenicidad, en una emergencia de salud.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento otorgado a este estudio a través del proyecto No. 66021 de los FONDOS MIXTOS SONORA-CONACYT y FONSEC-Salud (2003-C01-085).

CORRESPONDENCIA

DR. JESÚS HERNÁNDEZ
Laboratorio de Inmunología
Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo
A. C. Hermosillo 83000, SONORA, México
Tel./Fax: +52 662 289 2400
E-mail: jhdez@ciad.mx

Referencias bibliográficas

1. Yuen KY, Chan PK, Peiris M, Tsang DN, Que TL, Shortridge KF, *et al.* Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. *Lancet* 1998; 351: 467-71.
2. Hien TH, Liem NT, Dung NT, San LT, Mal PP, Chau N, *et al.* Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. *The New Eng J Med* 2004; 350: 1179-88.
3. Beigel J. Avian Influenza A (H5N1) infections in humans. *The New Eng J Med* 2005; 353: 1374-85.
4. World Health Organization. Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A(H5N1) Reported to WHO. 2008. Disponible en: <http://www.who.int/csr/disease/avian-influenza/en/index.html> (Fecha de acceso 9 de septiembre de 2008).
5. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawoaka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 1992; 56: 152-79.
6. Alexander DJ. A review of avian influenza in different bird species. *Vet Microbiol* 2000; 74: 3-13.
7. Chen H, Deng G, Li Z, Tian G, Li Y, Jiao P, *et al.* The evolution of H5N1 influenza viruses in ducks in southern China. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 10452-7.
8. Li KS, Guan Y, Wang J, Smith GJ, Xu KM, XU L, *et al.* Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature* 2004; 430: 209-13.
9. Ng LF, Barr I, Nguyen T, Noor SM, Tan RS, Agathe LV, *et al.* Specific detection of H5N1 avian influenza A virus in field specimens by a one-step RT-PCR assay. *BMC Infect Dis* 2006; 6: 40.
10. Hatta M, Hatta Y, Kim JH, Watanabe S, Shinya K, Nguyen T, *et al.* Growth of H5N1 influenza A viruses in the upper respiratory tracts of mice. *PLoS pathogens* 2007; 3: 1374-9.
11. Spackman E, Senne DA, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, *et al.* Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3256-60.
12. Stone B, Burrows J, Schepetiuk S, Higgins G, Hampson A, Shaw T, *et al.* Rapid detection and simultaneous subtype differentiation of influenza A viruses by real time PCR. *J Virol Methods* 2004; 117: 103-12.
13. Suarez DL, Das A, Ellis E. Review of rapid molecular diagnostic tools for avian influenza virus. *Avian Dis* 2007; 51: 201-8.
14. Payungporn S, Chutinimitkul S, Chaisingh A, Damrongwantanapokin S, Buranathai C, Amonsin A, *et al.* Single step multiplex real-time RT-PCR for H5N1 influenza A virus detection. *J Virol Method* 2006; 131:143-7.
15. Sambrook, J, Fritsch E, Maniatis T (eds.). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989.

Aceptado para su publicación el 3 de febrero de 2009