

Nuevas tendencias en el diagnóstico de enfermedades virales en los animales

New trends in the diagnosis of animal viral diseases

Carmen Laura Perera ^{1*}, Ana María Acevedo ¹

<http://opn.to/a/nITgL>



¹Grupo de Virología Animal, Dirección de Salud Animal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: El diagnóstico y control de las enfermedades virales de importancia económica ha progresado de forma notable en la última década, gracias a la aplicación de las tecnologías de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y a las diferentes aplicaciones de la misma, como son la reacción de PCR basadas en la detección de fluorescencia en tiempo real (rPCR), la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) y las técnicas basadas en la secuenciación de ácidos nucleicos. Estos enfoques permiten la amplificación, la cuantificación simultánea y el análisis de secuencias de ácidos nucleicos, donde se combinan rapidez con elevadas sensibilidad y especificidad; sus beneficios con relación a los ensayos de PCR convencional o de punto final incluyen, además de un elevado rango dinámico, reducido riesgo de contaminación cruzada, capacidad para ser escalados y cuantificación precisa de la diana, lo que permite la determinación de la carga viral.

Palabras clave: diagnóstico molecular, PCR, rPCR, secuenciación, LAMP.

ABSTRACT: The diagnosis and control of economically important viral diseases have progressed significantly in the last decade due to the application of polymerase chain reaction (PCR) technologies, as well as various applications thereof such as the PCR reaction based on the fluorescence detection in real time (rPCR), the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and the sequencing techniques based on nucleic acids. These approaches allow the amplification, simultaneous quantification and sequence analysis of nucleic acids, combining high speed with sensitivity and specificity, the benefits related to the conventional or endpoint PCR assays, a high dynamic range, a reduced cross contamination, the ability to be scaled, and the precise quantification of the target, allowing the determination of the viral load.

Key words: molecular diagnosis, PCR, rPCR, sequencing, LAMP.

*Autor para correspondencia: *Carmen Laura Perera*. E-mail: claura@censa.edu.cu

Recibido: 04/08/2017

Aceptado: 09/12/2017

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico molecular de las enfermedades infecciosas ha tenido, desde los años 90 hasta la actualidad, un desarrollo ascendente y ha venido a sustituir muchos de los ensayos clásicos de detección del agente infeccioso, principalmente en el campo de la virología. El diagnóstico de las entidades virales constituye uno de los mayores retos que enfrenta actualmente la Medicina Veterinaria, atendiendo a que algunos virus son difíciles de cultivar, se necesita contar con laboratorios especializados de cultivo de tejidos, personal entrenado en estas funciones y requiere de largos periodos de tiempo para emitir un diagnóstico confirmativo (1); además, el aislamiento viral requiere la manipulación y la amplificación de virus que eventualmente producen enfermedades muy graves para los animales y que pueden causar zoonosis en el hombre. El desarrollo progresivo en las últimas décadas de nuevas y mejores herramientas, para evidenciar la presencia de los agentes virales, hace posible que estas entidades se puedan diagnosticar y estudiar no solo a nivel de laboratorios especializados, sino también en los convencionales.

Con frecuencia, el diagnóstico de una infección viral se hace por el cuadro clínico del animal y la presencia de anticuerpos contra el agente viral sospechoso. Sin embargo, con la invención de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés: *Polymerase chain reaction*) por el Dr. Kary Mullis a principios de la década del 80 (2), se revolucionó en corto tiempo el conjunto de técnicas de la biología molecular. Su uso se extendió rápidamente a miles de laboratorios, no solo de investigación básica, sino también de diagnóstico clínico.

Los métodos basados en la PCR constituyen una valiosa alternativa frente a los ensayos clásicos de detección del agente que tienen sensibilidad y especificidad limitadas o requieren un tiempo prolongado para brindar los resultados del diagnóstico (3). Estas nuevas metodologías de diagnóstico, que tienen como principio la reacción de PCR, se han desarrollado en aras de poder usar el ensayo en muestras clínicas complejas para facilitar su detección y permitir la

detección y la diferenciación de múltiples ácidos nucleicos de manera simultánea. En el caso de rPCR, con la ventaja adicional de realizar la amplificación y la detección de forma simultánea en el propio termociclador en sistemas cerrados; así como en el caso de la amplificación isotérmica, donde no se requiere de un termociclador sino de un simple baño de agua.

Aunque los ensayos de PCR en sus inicios fueron costosos y engorrosos, hoy en día esta tecnología es relativamente barata, segura y utiliza mezclas de reactivos y juegos comerciales que facilitan su realización. Los procedimientos de PCR son sensibles y específicos y permiten el diagnóstico rápido y certero de enfermedades virales que producen importantes pérdidas económicas, entre las que se incluyen las que tienen similitud del cuadro clínico y de lesiones.

La presente revisión brinda un resumen sobre las nuevas tecnologías moleculares empleadas en el diagnóstico de las enfermedades virales de los animales. Este tema en la actualidad tiene una gran importancia, ya que permite el diagnóstico rápido y certero de enfermedades graves y la toma de medidas oportunas para minimizar los daños millonarios que pueden ocasionar estas enfermedades.

MÉTODOS BASADOS EN LA PCR Y SUS VARIANTES O MODIFICACIONES

PCR convencional

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos, en los que la secuencia blanco se copia fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células.

La PCR incluye ciclos repetidos de amplificación de la secuencia de ácido nucleico seleccionada. Cada ciclo consta de tres etapas. En la primera etapa, el ADN de cadena doble se desnaturaliza por calor, se rompen los puentes de hidrógeno y se separan ambas cadenas obteniéndose ADN de cadena sencilla. En la segunda etapa ocurre el alineamiento entre dos cebadores u oligonucleótidos iniciadores; estos son fragmentos complementarios que se unen a cada una de las dos cadenas del ADN que se va

amplificar. El tamaño de los cebadores es entre 18 y 30 nucleótidos de longitud. La tercera etapa se corresponde con la extensión, donde una ADN polimerasa sintetiza una cadena de ADN complementaria a cada una de las cadenas molde, adicionando nucleótidos al extremo de cada uno de los cebadores hibridados. Las nuevas cadenas sintetizadas sirven como molde en el siguiente ciclo. Los ciclos se repiten entre 20 y 45 veces hasta que resulta en una acumulación exponencial del fragmento de ADN amplificado (4).

Inicialmente, la PCR requería la adición de ADN polimerasa termolábil de *Escherichia coli* en cada ciclo, lo que limitaba sus aplicaciones, aunque uno de los primeros documentos que describe la detección del virus del papiloma humano (HPV) por PCR utiliza un dispositivo de pipeta automatizada para la adición de la polimerasa. La *Taq* polimerasa es la polimerasa más utilizada, que carece de una actividad 3'-5'exonucleasa. Hay otras enzimas disponibles, algunas de las cuales tienen propiedades que las hacen más adecuadas que la *Taq* para ciertos propósitos. Por ejemplo, *Pfu* de *Pyrococcus furiosus* tiene una fidelidad de copia más alta que la *Taq* y es una mejor opción para estudios de secuenciación o de expresión de proteínas (5).

Reverso transcripción-PCR

Se han desarrollado numerosas modificaciones del procedimiento convencional (6). Algunas de estas modificaciones ampliaron, en gran medida, las capacidades de diagnóstico de la PCR. Se desarrolló la reverso transcripción-PCR, conocida como RT-PCR (Reverse Transcription-PCR, por sus siglas en inglés). Esta modificación fue desarrollada para moléculas diana de ARN. Primeramente, a partir del ARN se obtiene un ADN complementario (ADNc), esta conversión se logra con el empleo de la enzima transcriptasa reversa o reverso transcriptasa (una polimerasa de ADN-ARN dependiente). En la primera ronda de la reacción, se pueden utilizar como cebador los hexámeros (oligonucleótidos de seis nucleótidos de secuencia aleatoria), que se unen al azar en cualquier región del ARN molde, o un oligonucleótido (en general un oligo dT) que permite la captura y la realización del ADNc a partir del ARNm o ARN con colas poliA. Una

vez que se obtiene el ADNc, este es amplificado usando ADN polimerasa.

Las reverso transcriptasas (RTase) más comúnmente usadas son la del virus de la leucemia murina (MMLV, Moloney murine leukemia virus, por sus siglas en inglés) y la reverso transcriptasa AMV del virus de la mieloblastosis aviar. Sin embargo, con el progreso de la tecnología más RTases fueron desarrolladas usando la tecnología recombinante. Por ejemplo, la SuperScript II y SuperScript III RTases son una versión de MMLV RTase, con reducción de la actividad de RNasa H y aumento de la estabilidad térmica. La PowerScript RTase es un mutante puntual de la MMLV RTase, la cual carece de la enzima RNasa H y retiene la actividad de polimerasa de tipo salvaje; es capaz, por tanto, de sintetizar fragmentos de ADNc más largos (7).

Las reacciones de RT convencional son fastidiosas debido a que la enzima no puede tolerar temperaturas más altas. En consecuencia, la RT y las etapas de PCR se separan normalmente, lo que limita la amplia aplicación de este método en diagnóstico clínico. Actualmente, muchas compañías proporcionan mezclas de ADN polimerasa y RTase comercial, por lo que hace posible el RT-PCR en un solo paso. Después de la etapa de transcripción inversa, las reacciones se calientan a una temperatura elevada (normalmente 95°C) para activar la ADN polimerasa estable al calor e inactivar de forma simultánea RTase. El simple paso de RT-PCR incrementa dramáticamente la capacidad diagnóstica de detectar patógenos de ARN virales (8).

PCR anidada o nested PCR

La PCR anidada se desarrolló, principalmente, para aumentar la sensibilidad del ensayo usando dos parejas de cebadores (9).

En una primera ronda, se amplifica de manera convencional con los dos cebadores más externos a la región que se desea amplificar. Seguidamente, el producto de este primer PCR se utiliza como molde para una segunda ronda, la cual utiliza cebadores internos a la región previamente amplificada. La sensibilidad de la PCR anidada es extremadamente alta debido al proceso de amplificación dual. La mayor

desventaja de esta reacción es el alto riesgo de contaminación cruzada durante la transferencia de los productos de amplificación de la primera ronda a un segundo tubo de reacción (10).

PCR semianidada o seminested PCR

La PCR semianidada es una modificación de la PCR anidada. En lugar de utilizar dos parejas de cebadores, utiliza el mismo primer cebador para ambas rondas (un total de tres cebadores). La PCR semianidada también es altamente sensible en comparación con la PCR anidada, pero la posibilidad potencial de contaminación cruzada es todavía una gran desventaja (11).

PCR múltiplex

La PCR múltiplex es un proceso de amplificación en la que dos o más parejas de cebadores específicos para diferentes dianas se introducen en el mismo tubo (12). Por lo tanto, más de un ADN diana en una muestra puede ser detectado simultáneamente (13,14,15). Es crítico diseñar cebadores que tengan temperaturas de hibridación similares, lo que a menudo requiere una extensa optimización.

Las ventajas que ofrecen estos PCR es que combinan la sensibilidad y la rapidez del PCR y eliminan la necesidad de evaluar las muestras clínicas independientemente para cada virus; permiten optimizar el uso de reactivos y disminuir el tiempo de diagnóstico. Sin embargo, tienen como característica que requieren de una cuidadosa optimización.

Disponer de una herramienta como esta es muy útil para realizar el diagnóstico diferencial de enfermedades graves muy relacionadas desde el punto de vista clínico y lesional, como la enfermedad de Newcastle y la influenza aviar altamente patógena. Estas enfermedades tienen un elevado potencial devastador en la industria avícola, donde es crucial el diagnóstico rápido para la toma de medidas efectivas que permitan el control de las mismas.

PCR / rPCR

La PCR convencional ha sido mejorada con la introducción de la PCR de segunda generación, conocida como la rPCR, pues ha resuelto muchas de las limitaciones prácticas asociadas con la PCR basada en gel y ha revolucionado el diagnóstico de patógenos humanos y animales en los laboratorios de Microbiología Clínica (16).

Esta es una técnica altamente sensible que permite la amplificación simultánea y cuantificación de secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de reporteros fluorescentes en la reacción.

Entre las ventajas más importantes de esta técnica se encuentran su amplio rango de detección (17), que le permite detectar cantidades mínimas de la muestra (menos de cinco copias), por lo que es posible analizar tamaños de muestra muy pequeños (17), ya que requiere 1000 veces menos cantidad de ARN que el PCR convencional. Además, tiene la capacidad de medición de datos en tiempo real durante la fase de crecimiento exponencial, a diferencia de la prueba convencional que hace la medición en la fase *plateau* y capta la emisión de fluorescencia por parte del fluoróforo, la cual es directamente proporcional a la cantidad de productos amplificados. De esta manera, la prueba no requiere de procesamientos posteriores (17), lo que reduce el tiempo de ejecución de la misma y el riesgo de contaminaciones cruzadas.

El progreso de la reacción de amplificación del rPCR se realiza a través de un sistema fluorométrico, que consiste en el uso de fluoróforos. Estos pueden ser de dos tipos: fluoróforos con afinidad por el ADN (método no específico) y sondas específicas para fragmentos del ADN, es decir, que solo emiten fluorescencia cuando se ha amplificado un fragmento del ADN de interés (métodos específicos).

Los métodos no específicos se basan en el uso de moléculas intercalantes que tienen afinidad por el ADN de doble cadena y que al ser oxidados generan una señal fluorescente. La fluorescencia emitida se captura en la etapa de extensión de cada ciclo y es proporcional al número de copias de ADN de doble cadena obtenidas en cada ciclo de la PCR. El reportero más usado para estos fines es el SYBR Green (18); este es una molécula cargada positivamente que, mientras esté en solución sin unirse al ADN de doble cadena, prácticamente no emite fluorescencia; sin embargo, cuando se une al surco menor del ADN incrementa hasta 1000 veces su fluorescencia. Aunque el SBYR Green es uno de los reporteros fluorescentes más utilizados por los investigadores debido a su bajo costo, la principal desventaja es que puede unirse

a cualquier molécula de ADN de doble cadena, incluyendo dímeros de cebadores. Por lo anterior, para un uso correcto del SYBR Green en la rPCR, es obligatorio verificar la especificidad de la señal mediante el análisis de curvas de disociación. Esta representa la medición de la temperatura o de las temperaturas de fusión de el o los productos amplificados, al analizar la curva de disociación y comprobar que la señal de fluorescencia obtenida se debe solo a la amplificación del blanco. En la actualidad la mayoría de los *software* de los termocicladores ofrecen esta función que es fácil de aplicar y analizar.

Los métodos específicos parten de principios distintos a los no específicos y tienen en común la señal de fluorescencia emitida para detectar los productos amplificados. Estos métodos se basan en el principio FRET (Flouescence Resonance Energy Transfer, por sus siglas en inglés), que consiste en la transferencia de energía entre dos fluoróforos: un donador (reportero) y un aceptor (apagador o *quencher*), los cuales emiten fluorescencia a diferente longitud de onda. Cuando el reportero y el apagador se encuentran próximos, el apagador absorbe toda la fluorescencia del reportero. Cuando este par de moléculas se separa, la fluorescencia del reportero no puede ser absorbida por el apagador y, en consecuencia, puede ser detectada por el fotodetector del equipo de PCR. Los sistemas de detección específicos se pueden dividir en tres tipos: a) sondas de hidrólisis, b) sondas de hibridación y c) sondas de horquilla. Los primeros se basan en sondas fluorescentes de oligonucleótidos etiquetados con un reportero fluorescente y un apagador, ambos se encuentran en estrecha unión mientras la sonda no hibride a su secuencia blanco. Cuando hibrida, ocurren cambios conformacionales en el reportero y en el apagador, lo que permite que la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa rompa esta unión y logre que la fluorescencia emitida por el reportero sea liberada y capturada por el equipo.

Estos métodos son muy seguros, ya que no habrá amplificación ni señal de fluorescencia mientras no haya unión de la sonda a su blanco; es por esto que la especificidad es muy alta. Un ejemplo de estos sistemas son las sondas

comerciales conocidas como TaqMan (19), aunque existen otras en el mercado.

Los métodos por hibridación consisten en una sonda unida a un reportero fluorescente que está en estrecha proximidad con un apagador fluorescente unido a otra sonda. Tanto el reportero como el apagador presentan un espectro de excitación y de emisión similar, de tal forma que cuando las dos sondas hibriden a su blanco, el reportero es excitado y la señal emitida se transfiere al apagador, por lo que genera un incremento en la cantidad de fluorescencia. En el caso de los métodos de horquillas, consiste en que en este tipo de sonda el reportero fluorescente y el apagador se encuentran formando una horquilla, estructura que los mantiene cercanos para poder llevar a cabo la transferencia de energía y mantener al reportero apagado. Al unirse a la secuencia de interés, la horquilla se extiende, aumentando la distancia entre el apagador y el reportero, permitiendo detectar la fluorescencia de este último. Estas sondas de horquilla son altamente específicas. Existen varias que utilizan este principio como son las molecular Beacons y Scorpions. Los métodos específicos son más costosos que los no específicos, pero son más eficientes al garantizar la especificidad de la reacción y al evitar la formación de productos inespecíficos. (20).

La PCR en tiempo real es ampliamente utilizada en la detección y vigilancia de muchas enfermedades virales como la influenza aviar, debido a su alta sensibilidad, buena reproducibilidad y rango dinámico ancho de cuantificación, con potencial de alto rendimiento y proyección de un gran número de muestras.

Combinado con los sistemas de PCR/RT-PCR en tiempo real, el PCR multiplex ofrece un diagnóstico más rápido que los sistemas multiplex basados en las técnicas de PCR clásicas. Considerando las ventajas diagnósticas de este principio, varios ensayos de PCR multiplex han sido desarrollados para el diagnóstico de diferentes enfermedades de interés veterinario. Entre ellos se encuentran los ensayos para detectar diferentes genotipos o serotipos de virus, como es el RT-PCR en tiempo real desarrollado para la simultánea detección y diferenciación de serotipos Massachusetts y no Massachusetts del virus de la bronquitis

infecciosa (21), del virus de la fiebre aftosa (22) y la peste porcina clásica (23). Otros han sido desarrollados y empleados en el diagnóstico de rutina para la detección de coronavirus respiratorio bovino (4), para la detección simultánea de los virus de la peste porcina clásica y la peste porcina africana (24). Además, el multiplex PCR ha sido usado en la detección de virus respiratorios comunes, como los virus de influenza A y B y el virus sincitial respiratorio, a partir de muestras nasofaríngeas (25,26,27,28) y para diferenciar virus en el cerdo que provocan síndromes respiratorios y reproductivos, como son: el circovirus porcino tipo 2, parvovirus porcino, el virus de la enfermedad de Aujeszky y Torque teno sus virus 1 y 2 (29).

MÉTODOS BASADOS EN LA SECUENCIA DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Secuenciación de ácidos nucleicos

El análisis más detallado de la estructura del ADN consiste en conocer la secuencia de nucleótidos. A finales de los años 70 comenzaron a desarrollarse los métodos para la secuenciación de fragmentos de ADN. Tanto el método químico desarrollado por Allan Maxam y Walter Gilbert, como el método enzimático o de los "dideoxi", desarrollado por Fred Sanger, compartían un principio común: la generación de cadenas sencillas de ADN, marcadas radiactivamente y cuyo tamaño se diferenciaba del de la siguiente cadena en una única base, y que podían separarse por su diferente movilidad electroforética en geles desnaturizantes donde los diferentes fragmentos, capaces de impresionar una placa de autorradiografía, aparecían como una escalera de bandas. La productividad anual de la técnica era aproximadamente de 1500 bases/persona (30).

El método de Sanger sigue empleándose en la actualidad, pues ha resultado el más sencillo de automatizar (secuenciadores capilares semiautomáticos basados en detección de emisión de fluorescencia) y ha permitido obtener secuencias más largas (800-1000 nucleótidos). Hoy en día, las cadenas de diferente longitud se generan cíclicamente mediante PCR, al incorporarse de forma aleatoria durante la copia de la cadena molde de ADN dideoxinucleótidos (ddNTPs) marcados fluorescentemente que impiden la elongación posterior de la cadena y la

dejan marcada en su extremo 3' para su detección posterior. Cada fluorocromo en 3' va asociado inequívocamente a un nucleótido (A, G, C o T). La emisión de fluorescencia detectada tras la excitación, mediante un láser de cada fragmento separado electroforéticamente en el capilar, se transforma por el software del equipo en una secuencia de ADN. Los equipos más productivos trabajan de forma continua con 96 o 384 capilares independientes, cada uno de los cuales puede "leer" en una hora aproximadamente 1000 pares de bases (1 Kb) con una fiabilidad del 99,99 % (30).

El desarrollo de las técnicas de secuenciación de ADN permitió que a partir de los años 90 empezaran a conocerse las secuencias de genomas modelo como *Sacharomyces cerevisiae* (12.1 Mb; 1 Mb equivale a un millón de pares de bases) (1996); *Escherichia coli* (4.6 Mb) (1997); *Caenorhabditis elegans* (100 Mb) (1998), *Drosophila melanogaster* (140 Mb) (2000), *Arabidopsis thaliana* (125 Mb) (2001) y de otros muchos organismos más (31). Pero quizás el hito más divulgado fue la publicación simultánea en 2001 por parte del Consorcio Público y de una empresa privada (Celera Genomics) de la secuencia del Genoma Humano (3.300 Mb) (32).

El desarrollo reciente de los llamados "Secuenciadores de Nueva Generación" basados en Nanotecnología han significado en este campo un salto cuantitativo muy importante gracias a su extraordinaria productividad (cientos y miles de Mb en pocas horas) y un gran salto cualitativo debido a las numerosas y diversas aplicaciones que permiten abordar resecuenciación y secuenciación *de novo* de genomas y metagenomas (conjunto de genomas presentes en un medio determinado: flora intestinal, microorganismos de fondos marinos, entre otros); análisis completos de transcriptomas (conjunto de todos los mRNAs que se expresan en un momento determinado en una célula o un organismo); análisis de modificaciones epigenéticas (modificaciones como la metilación en las bases del ADN que afectan a la expresión génica en secuencias genómicas) (33).

Pirosecuenciación

Pasaron cerca de 30 años desde la publicación del método de Sanger hasta que apareciera una

nueva tecnología de secuenciación que no fuera el método de ddNTPs. La principal característica de estas nuevas tecnologías es la posibilidad de secuenciado masivo de forma paralela; esto significa que el número de secuencias obtenidas supera muchas veces el máximo de 96 secuencias por corrida que se obtienen con los secuenciadores capilares de última generación que utilizan el método de secuenciación de Sanger. A partir del desarrollo del método de pirosecuenciación, primer método de secuenciación masivo utilizado, surgen nuevas alternativas de secuenciación que utilizan el mismo principio de ddNTPs en sus protocolos, aunque con mejoras innovadoras. Estos métodos de secuenciación masivos no ofrecen lecturas tan largas como el método clásico de Sanger, aunque en pocos años se ha mejorado sustancialmente el largo de las secuencias obtenidas y alcanzan, en algunos casos, longitudes comparables a Sanger.

Este método no utiliza nucleótidos terminadores. En este caso se realizan ciclos donde se ofrece en cada pocillo una base por vez, secuencialmente. Durante la incorporación de una base en una molécula nascente de ADN se libera pirofosfato; el pirofosfato liberado se convierte en luz mediante dos procesos enzimáticos. La luz emitida en cada pocillo, donde se incorporó la base ofrecida, se monitorea por la detección luminométrica de la liberación del pirofosfato durante la reacción de síntesis. Una cámara colecta los datos de cada base, en cada ciclo y en cada posición.

Como parte de una mayor vigilancia para la aparición de virus resistentes, el método de pirosecuenciación ha demostrado ser una poderosa técnica; se ha utilizado para la rápida detección de marcadores moleculares de resistencia a los bloqueadores de los canales iónicos-M2 e inhibidores de la neuraminidasa (NA) en la influenza A H5N1 (34) y recientemente se ha empleado para detectar y cuantificar la resistencia al fármaco inhibidor de la NA (35). También se ha explorado el uso de la pirosecuenciación de alto rendimiento para la vigilancia de los virus ARN transmitidos por artrópodos (36).

Microarreglos de ADN o microarrays de ADN

La tecnología de microarrays del ADN contiene oligonucleótidos inmovilizados y se puede utilizar para detectar miles de secuencias de ácidos nucleicos diferentes al mismo tiempo. Una matriz de ADN, MChip, fue desarrollada para subtipos del virus de la influenza A; esta selecciona un segmento del gen de la matriz de la influenza A. Este método fue evaluado con los 16 subtipos del virus y fue capaz de detectar el segmento de gen de la matriz en todos los casos. En el año 2009, una nueva versión de los microarrays (gripe TessArray RPM 3.0 y 3.1 [teselas, LLC, VA, EE.UU.] se diseñó para la identificación y detección de todos los subtipos de virus de la influenza (37). Huang *et al.* (38) desarrollaron un ensayo de combinación de un paso de transcripción reversa-PCR multiplex con la tipificación y subtipificación de un microarray, dirigida a las hemoaglutininas y NAs H1, H3, H5 y N1, N2 y los genes de la matriz de la influenza A y NS de genes del virus de la influenza virus B (38).

Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle (LAMP)

Otra variante de la técnica de PCR es la llamada Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle (LAMP por sus siglas en inglés: *Loop-Mediated Isothermal Amplification Method (LAMP)*). Esta metodología utiliza múltiples cebadores y condiciones isotérmicas (60-65°C) para la amplificación de la secuencia blanco, en un tiempo relativamente corto (30 min a una hora), utilizando la Bst-ADN polimerasa (Bst-ADNpol). LAMP no requiere termociclador para garantizar los ciclos de desnaturalización-reasociación para la hibridación de los cebadores y la actividad de la polimerasa, como ocurre en la PCR. Similar a una reacción de PCR anidada ("nested PCR"), el LAMP requiere de varios cebadores, de cuatro a seis, que reconocen y se unen por homología a distintas regiones del blanco. La síntesis de ADN es producto de la actividad de polimerización y desplazamiento de cadena de ADN por parte de la polimerasa, debido al anclaje permanente de los cebadores sobre los productos de amplificación que se generan. La reacción genera en corto tiempo una

cantidad extraordinaria del producto de amplificación. El proceso es altamente específico y de una sensibilidad comparable al mejor ensayo de PCR. La observación del producto de amplificación puede hacerse visualmente por turbidez o por cambio de color asociado a reactivos propios de la reacción. Dada la simplicidad de LAMP, se han desarrollado distintos ensayos de altas especificidad, sensibilidad y facilidad de uso en condiciones de campo para el diagnóstico molecular de varios agentes infecciosos (39). También se ha utilizado para detectar virus de influenza A subtipo H3 y H1, cepas de virus de la influenza B y el virus de la leucosis aviar del subgrupo J.

CONCLUSIONES

La presente revisión brinda una recopilación de las técnicas moleculares más utilizadas para el diagnóstico de las enfermedades virales que afectan a los animales, teniendo en cuenta las nuevas tendencias que rigen el diagnóstico de las mismas. Las técnicas moleculares presentadas en esta revisión son herramientas muy útiles, por lo que resulta muy importante difundir los fundamentos de las mismas para aplicar un buen sistema de vigilancia, basado en el diagnóstico efectivo de la enfermedad.

REFERENCIAS

- 1 -Herrero U. Capítulo 6. Estrategias generales para el diagnóstico en virología. En: *Procedimientos en Virología Médica*. 1. Ed. San José. C.R. Editorial de la Universidad de Costa Rica. 2004. Pp. 80-93.
- 2 -Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985;230(4732):1350-4.
- 3 -Hoffmann B, Beer M, Reid SM, Mertens P, Oura CA, van Rijn PA, et al. A review of RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organisation for Animal Health. *Vet Microbiol*. 2009; 39:1-23.
- 4 -Belák S. Molecular diagnosis of viral diseases, present trends and future aspects A view from the OIE Collaborating Centre for the Application of Polymerase Chain Reaction Methods for Diagnosis of Viral Diseases in Veterinary Medicine. *Vaccine*. 2007;25:5444-5452.
- 5 -Skerra A. Phosphorothioate primers improve the amplification of DNA sequences by DNA polymerases with proofreading activity. *Nucleic Acids Res*. 1992;20:3551-3554.
- 6 -Wagar EA. Direct hybridization and amplification applications for the diagnosis of infectious diseases. *J Clin Lab Anal*. 1996;10:312-325.
- 7 -Mittermeier RA. Conservation International and biodiversity conservation. *Nature*. 2000;405:255.
- 8 -Qian K. Detection of HCV RNA in serum by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). *Methods Mol Med*. 1999;19:47-53.
- 9 -Dybon K, Varrasso A, Ficorilli N. Identification of equine herpesvirus 3 (equine coital exanthema virus), equine gammaherpesviruses 2 and 5, equine adenoviruses 1 and 2, equine arteritis virus and equine rhinitis A virus by polymerase chain reaction. *Aust Vet J*. 2001;79:695-702.
- 10 -Erlich HA, Gelfand D, Sninsky JJ. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science*. 1991;252:1643-1651.
- 11 -Zhang L, Pan Z, Geng S. Sensitive, semi-nested RT-PCR amplification of fusion gene sequences for the rapid detection and differentiation of Newcastle disease virus. *Res Vet Sci*. 2010;89:282-289.
- 12 -Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13:559-570.
- 13 -Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res*. 1988;16:11141-11156.

- 14 -Mishra B, Sharma M, Pujhari SK. Clinical applicability of single-tube multiplex reverse-transcriptase PCR in dengue virus diagnosis and serotyping. *J Clin Lab Anal.* 2011;25:76-78.
- 15 -Mihaly I, Kolozsi T, Liptai Z. Experience with multiplex nested PCR and fluorescent antibody tests in the diagnosis of acute central nervous system infections with herpes simplex virus type 1 and 2. *Orv Hetil.* 2010;151:1896-1903.
- 16 -Beck ET, Henrickson KJ. Molecular diagnosis of respiratory viruses. *Future Microbiol.* 2010;5:901-916.
- 17 -Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education.* 2005;29: 151-159.
- 18 - Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:103.
- 19 - Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* 1995;4:357-362.
- 20 -Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol.* 1996;14:303-308.
- 21 -Acevedo AM, Perera CL, Vega A, Ríos L, Coronado L, Relova D, et al. A duplex SYBR Green I-based real-time RT-PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of Massachusetts and non-Massachusetts serotypes of infectious bronchitis virus. *Mol Cell Probes.* 2013;27(5-6):184-92.
- 22 -Tam S, Clavijo A, Engelhard EK, Stanley T, Alfonso C, Eric KE, et al. Fluorescence-based multiplex real-time RT-PCR arrays for the detection and serotype determination of foot-and-mouth disease virus. *J Virol Methods.* 2009;161:183-191.
- 23 -Huang YL, Pang VF, Pan CH, Chen TH, Jong MH, Huang TS, et al. Development of a reverse transcription multiplex real-time PCR for the detection and genotyping of classical swine fever virus. *J Virol Methods.* 2009;160:111-118.
- 24 -Haines FJ, Hofmann MA, King DP, Drew TW, Crooke HR Development and Validation of a Multiplex, Real-Time RT PCR Assay for the Simultaneous Detection of Classical and African Swine Fever Viruses. *PLoS ONE.* 2013;8(7): e71019. doi:10.1371/journal.pone.0071019.
- 25 -Hymas WC, Mills A, Ferguson S. Development of a multiplex real-time RTPCR assay for detection of influenza A, influenza B, RSV and typing of the 2009-H1N1 influenza virus. *J Virol Methods.* 2010;167:113-118.
- 26 -Shisong F, Jianxiong L, Xiaowen C. Simultaneous detection of influenza virus type B and influenza A virus subtypes H1N1, H3N2, and H5N1 using multiplex real-time RT-PCR. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;90:1463-1470.
- 27 -Chen Y, Cui D, Zheng S. Simultaneous detection of influenza A, influenza B, and respiratory syncytial viruses and subtyping of influenza A H3N2 virus and H1N1 (2009) virus by multiplex real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2011;49:1653-1656.
- 28 -Beck ET, Jurgens LA, Kehl SC. Development of a rapid automated influenza A, influenza B, and respiratory syncytial virus A/B multiplex real-time RTPCR assay and its use during the 2009 H1N1 swine-origin influenza virus epidemic in Milwaukee, Wisconsin. *J Mol Diagn.* 2010;12:74-81.
- 29 -Pérez LJ, Perera CL, Frías MT, Núñez JI, Ganges L, Díaz de Arce H. A multiple SYBR Green I-based real-time PCR system for the simultaneous detection of porcine circovirus type 2, porcine parvovirus, pseudorabies virus and Torque teno sus virus 1 and 2 in pigs. *J Virol Methods.* 2012;179:233-241.
- 30 -Rodríguez-Tarduchy G. ¿Hablamos de gen o más? 2007. <http://www.editorialhelice.es/serie-tangente/hablamos-de-gen-o-mas.html>
- 31 - Genome News Network. 2004. (<http://www.genomenewsnetwork.org>)

- 32 -Venter JC. The sequence of the human genome. *Science*. 2001;291(5507):1304-1351.
- 33 - Metzker ML. Sequencing technologies the next generation. *Nature Reviews Genetics*. 2010;11:31-46.
- 34 - Deyde VM, Nguyen T, Bright RA, Balish A, Shu B, Lindstrom S, et al. Detection of molecular markers of antiviral resistance in influenza A (H5N1) viruses using a pyrosequencing method. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(3):1039-1047.
- 35 - Bishop-Lilly A. Arbovirus Detection in Insect Vectors by Rapid, High- Throughput Pyrosequencing. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(11):878.
- 36 - Lin BC, Malanoski AP, Wang Z, Blaney KM, Long NC, Meador CE, et al. Universal detection and identification of avian influenza virus by use of resequencing microarrays. *J Clin Microbiol*. 2009;47(4):988-993.
- 37 - Huang Y, Duffy S, Hong Y, Norman S, Ghosh M, He J, et al. Multiplex assay for simultaneously typing and subtyping influenza viruses by use of an electronic microarray. *J Clin Microbiol*. 2009;47(2):390-396.
- 38 - Njiru ZK, Mikosza AS, Armstrong T, Enyaru JC, Ndung'u JM, Thompson AR. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Method for Rapid Detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2(2):e147. doi:10.1371/journal.pntd.0000147.
- 39 - Ito M. Rapid detection and typing of influenza A and B by loop-mediated isothermal amplification: comparison with immunochromatography and virus isolation. *J Virol Methods*. 2006;135(2):272-275.

Los autores de este trabajo declaran no presentar conflicto de intereses.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

La mención de marcas comerciales de equipos, instrumentos o materiales específicos obedece a propósitos de identificación, no existiendo ningún compromiso promocional con relación a los mismos, ni por los autores ni por el editor.