

DETECCIÓN DE SECUENCIAS GENÓMICAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA MEDIANTE LA HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS: UN ENFOQUE PARA EL DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN PERSISTENTE

I.E. BERGMANN, V. MALIRAT, P. AUGÉ DE MELLO, I. GOMES

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)
Caixa Postal 589, 20001-970 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

RESUMEN. Se ha desarrollado un ensayo de hibridación capaz de detectar secuencias genómicas del virus de la fiebre aftosa (VFA) en muestras de cultivos de células infectadas o de fluidos esofágico-faríngeos (OP). El ensayo se basa en el uso de una sonda marcada de ADN complementaria a la región que codifica para la polimerasa del VFA. La sonda se obtuvo amplificando en *E. coli* un plásmido conteniendo el fragmento de ADN complementario (cADN) a la región de 6,3 a 7,8 kilobases del genoma del VFA. Debido al alto grado de homología de la secuencia de ácidos nucleicos en esta parte del genoma, fue posible la detección de los tres serotipos sudamericanos en un único ensayo de hibridación. Los resultados positivos obtenidos con muestras de OP de animales experimentalmente infectados extraídas a tiempos tardíos de la infección, durante los cuales la recuperación de virus era principalmente negativa, revelaron el considerable potencial de este método como complemento de los procedimientos convencionales de diagnóstico de infección persistente.

La incidencia de la fiebre aftosa (FA) en los países de América del Sur ha disminuido considerablemente debido a los programas de erradicación en vigencia. Algunas regiones han alcanzado recientemente, o están a punto de obtener, reconocimiento internacional como libres de la enfermedad. Bajo estas circunstancias, son de enorme importancia los ensayos de laboratorio que indiquen en forma confiable la presencia o ausencia del virus en los animales y sus productos. La disponibilidad de técnicas precisas y sensibles es particularmente relevante debido a la habilidad del VFA de producir, además de la enfermedad

aguda, una infección persistente, tanto en animales inmunizados como en no inmunizados (3,7,13,14,27-29).

El diagnóstico de rutina de infección persistente se lleva a cabo por una combinación del aislamiento viral a partir de fluidos esofágico-faríngeos (OP) en una línea de células susceptibles (7,15,25,26) con ensayos serológicos de anticuerpos contra el VFA (1,8,9,16,17,23). Estos procedimientos pueden no rendir siempre resultados conclusivos, en parte debido a que el aislamiento de virus a partir de fluidos OP se torna particularmente intermitente durante las fases tardías de la infección. Ha sido mostrado experimentalmente que pueden ocurrir periodos de hasta 200 días entre dos recuperaciones virales consecutivas (4,12,19).

Solicitar separatas al:
Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS).

La detección de genomas virales por medio de hibridación de ácidos nucleicos con sondas específicas marcadas (21) representa un enfoque alternativo que en parte puede superar las potenciales limitaciones encontradas en el ensayo de infectividad (5). Con el fin de introducir la hibridación de ácidos nucleicos como una herramienta de diagnóstico de infección subclínica el ADN complementario (cADN) al ARN genómico del VFA O₁ Campos Br 1/58 fue clonado en el plásmido pBR322 para su amplificación (5). El cADN del VFA correspondiente a la región de 6,3 a 7,8 kilobases del genoma viral (que codifica para la polimerasa) marcado radioactivamente se usó como sonda para detectar las secuencias blanco de ARN.

Las muestras de ARN se desnaturalizaron a 60°C durante 15 min en formaldehído al 8,5%, 6x SSC (1x SSC consiste en NaCl 0,15M, y citrato de sodio 0,015M pH 7,0) y se colocaron en la membrana de nylon pre-equilibrada en 6x SSC por medio de un aparato de microfiltración para dot-blot. Los filtros se secaron y se trataron con irradiación UV. La prehibridación se llevó a cabo durante 12 h a 42°C en 4x SSC, 50% formamida deionizada, 5x Denhardt (Ficol 0,1%, polivinilpirrolidona 0,1% y seroalbúmina bovina 0,1%), fosfato de sodio 40 mM pH 6,5, SDS 0,1% y 250 µg/ml de ADN de esperma de salmón sonicado y desnaturalizado.

El plásmido que contenía el fragmento de cADN de la región que codifica para la polimerasa fue amplificado por crecimiento en *E. coli* y purificado por el método de Birnboim y Dolly (6). El inserto de cADN se separó del vector plasmídico por digestión con Pst I, y se purificó por electroforesis en gel seguida de tratamiento con Gene Clean, como describe el productor (Bio 101 Inc., La Jolla, CA*). La sonda se marcó con ³²P por medido de "nick-translation" usando [α-³²P]dCTP (3000 Ci/mmol, NEN, Boston, MA*), y se purificó por Gene Clean. Se obtuvieron actividades específicas por encima de 10⁸ cpm (Cerenkov)/µg de sonda de ADN.

La hibridación se llevó a cabo con la sonda desnaturalizada a una concentración de 10 ng cADN/ml durante 15 h en bolsas de plástico sellables sumergidas en un baño de agua bajo las mismas

condiciones usadas para la prehibridación. Los filtros se lavaron secuencialmente 2 veces con 2x SSC, SDS 0,1% durante 15 min a temperatura ambiente, 2 veces con 0,1x SSC, SDS 0,1% durante 15 min a 42°C y finalmente en 0,1x SSC, SDS 0,1% durante 15 min a 55°C, hasta que no se detectó más radioactividad en el tampón de lavado.

La especificidad de la sonda para la hibridación se demostró mediante el uso de ARN de células de riñón de cría de hamster (BHK) infectadas y no infectadas con VFA. Esencialmente no se observó reactividad cuando ARN de células BHK no infectadas se hibridó con el fragmento de cADN clonado, marcado con ³²P, que cubría la región que codifica para la polimerasa del VFA. En contraposición se observó significativa reactividad cuando ARN de células BHK infectadas con VFA cepas O₁ Campos Br-1/58, C₃ Resende Br/55 y A₂₄ Cruzeiro Br-1/55 fue hibridado con la sonda de cADN del VFA (figura 1). Este amplio espectro de detección puede explicarse por el alto grado de homología en la secuencia de ácidos nucleicos existente entre los distintos serotipos en la región que codifica para la ARN polimerasa (20). Además, no se detectó reactividad cuando preparaciones de ARN viral previamente tratadas con 100 µg/ml de ARNasa A durante 1 h a 37°C se hibridaron con la sonda de cADN del VFA. Así, una hibridación positiva con cADN de VFA, marcado con ³²P, correspondiente a la región que codifica para la polimerasa a ARN, correlaciona exclusivamente con la presencia de ARN del VFA. Bajo las condiciones usadas para las hibridaciones, el nivel mínimo de detección fue de 2 pg de ARN purificado de VFA (figura 1).

Para evaluar la detección del ARN del VFA en fluidos OP de animales persistentemente infectados en fases tardías, muestras de OP obtenidas a tiempos tardíos de seis animales infectados experimentalmente y de un bovino control no infectado fueron analizadas por hibridación dot-blot. El estado persistente fue indicado por el

* La mención de firmas comerciales o de sus productos es solamente para identificación y no constituye endoso por los autores o sus organizaciones.

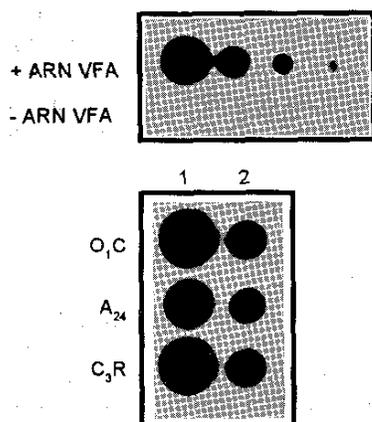


Figura 1. Hibridación por dot-blot del ARN total de células BHK infectadas con la sonda de cADN del VFA clonado y marcado. Las células se infectaron con las cepas de VFA O₁ Campos Br1/58 (O₁C), A₂₄ Cruzeiro Br1/55 (A₂₄) o C₃ Resende Br/55 (C₃R) a una multiplicidad de infección de 20 ufp/célula. El ARN total se aisló cuando cerca del 80% de las células exhibían efecto citopático. 1 µg (columna 1) y 0,1 µg (columna 2) fueron aplicados a la membrana de nylon e hibridados con el fragmento de cADN marcado con ³²P correspondiente a la región que codifica para la polimerasa, como se describió en el texto. Las reactividades de referencia (+ARN VFA) consistieron, de izquierda a derecha, de: 2 ng, 200 pg, 20 pg y 2 pg de ARN purificado de VFA, sembrados en presencia de 1 µg de ARN total de células BHK no infectadas. 1 µg de ARN de células BHK no infectadas (-ARN VFA) sirvió como control negativo. La exposición autoradiográfica se realizó durante 18 h a -70°C.

aislamiento ocasional de virus a partir de fluidos OP, así como por la presencia de anticuerpos contra virus replicativo (4,22). Muestras de ARN extraídas de fluidos OP que resultaban negativos por ensayos de infectividad viral a los 532 días posinoculación (DPI), se unieron a una membrana de nylon y se incubaron con la sonda marcada radioactivamente. Como se ve en la figura 2, el procedimiento de dot-blot detectó secuencias virales en los animales 1, 3, 4 y 6, mientras que no se

detectó hibridación para los otros dos animales persistentemente infectados. Estos resultados en los cuales muestras que no rendían virus infectivo resultaban positivas en el ensayo de hibridación por dot-blot confirman observaciones previas (24) y demuestran el valor de este procedimiento en las etapas bien tardías de recuperación de la infección con VFA.

El significado de la detección de secuencias genómicas por dot-blot en muestras que eran negativas por ensayos de infectividad, precisa ser clarificado. Se ha propuesto que el ensayo de dot-

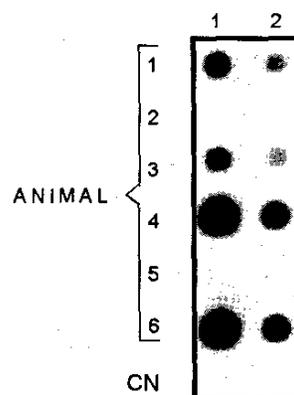


Figura 2. Hibridación por dot-blot del ARN total de fluidos OP con el cADN del VFA marcado. Las infecciones persistentes experimentales con la cepa O₁ Campos Br1/58 fueron establecidas como fuera descrito (4,19). El material de OP fue colectado de los animales experimentalmente infectados por extracción "probang" (27,29). El ARN de OP, aislado usando el método de guanidina/centrifugación en cloruro de cesio (18), fue posteriormente extraído 2 veces con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25-24-1 [vol/vol]) y recuperado por precipitación con etanol. 20 µg (columna 1) y 2 µg (columna 2) del material fueron unidos a la membrana de nylon e hibridados con la sonda de VFA, como se describió en el texto. Las filas 1 a 6 corresponden a ARN total de OP de los diferentes animales infectados. CN, control negativo, consistió de 20 µg (columna 1) y 2 µg (columna 2) de ARN total de OP de un bovino no infectado.

blot podría estar detectando la presencia de mutantes virales no infectivos o de genomas incompletos (24), los cuales, se sabe, ocurren en cultivos de células persistentemente infectados (10). Alternativamente, los ensayos de infectividad podrían estar fallando en detectar la presencia de virus replicativo en algunos de los fluidos OP por razones que no son claras. En todos los animales estudiados pudo recuperarse virus infectivo en algunas muestras OP obtenidas a tiempos más tardíos que el muestreo tomado a los 532 DPI. Así la hibridación molecular resulta útil como un ensayo complementario para detectar un riesgo potencial con VFA infectivo, particularmente en el caso de la persistencia tardía, cuando el aislamiento de virus a partir de fluidos OP es poco frecuente.

Debe ser notado, sin embargo, que los animales 2 y 5, que eran negativos por dot-blot a los 532 DPI, también revelaron virus infectivo a tiempos más tardíos. Esto sugiere que en algunos casos el virus está presente en muy pequeñas cantidades y/o que lo que se está observando representa una presencia temporaria del virus en la región OP. Solo se dispone de información limitada acerca del mecanismo de replicación del virus en la región OP y/o de su excreción, así como de la localización del virus en el animal durante la persistencia (2,11,30). La hibridación de ácidos nucleicos con o sin previa amplificación de la muestra por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) está siendo aplicada en el presente como una herramienta sensible para estudiar el mantenimiento del ARN del VFA en la región OP y/o su presencia potencial en otros tejidos y fluidos. Resultados preliminares indicaron la presencia de secuencias genómicas virales en las células blancas de la sangre, así como en otros tejidos de animales persistentemente infectados (manuscrito en preparación).

Una mayor aplicación de esta técnica se requiere para evaluar el significado de un ensayo de hibridación. Hasta contar con más información, un resultado de hibridación positivo inicialmente debería acarrear la connotación de que el animal ha sido expuesto al VFA, aun cuando no se puede determinar si el ácido nucleico reaccionante es infectivo o si está presente en niveles suficientes

para representar un potencial riesgo epidemiológico. Se debe tener presente que la evidencia disponible acerca de la potencial transmisión del animal persistentemente infectado hacia un hospedador susceptible es tanto limitada cuanto circunstancial.

REFERENCIAS

1. ALONSO FERNANDEZ, A., AUGÉ DE MELLO, P., GOMES, I., ROSENBERG, F. El uso del antígeno asociado a la infección viral (VIA) en la detección de ganado expuesto al virus de la fiebre aftosa. /The use of virus-infection-associated antigen (VIA) in the detection of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 17-18:17-22, 1975.
2. AUGÉ DE MELLO, P., HONIGMAN, M.N., FERNANDES, V. Supervivencia en bovinos del virus modificado de la fiebre aftosa. *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 65:2091-2106, 1966.
3. AUGÉ DE MELLO, P., HONIGMAN, M.N., FERNANDES, M.V., GOMES, I. Further information on the survival of modified foot-and-mouth disease virus in cattle. *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 73:489-505, 1970.
4. BERGMANN, I.E., AUGÉ DE MELLO, P., NEITZERT, E., BECK, E., GOMES, I. Diagnosis of persistent aphthovirus infection and its differentiation from vaccination response in cattle by use of enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis with bioengineered nonstructural viral antigens. *Am. J. Vet. Res.*, 54 (6):825-831, 1993.
5. BERGMANN, I.E., MALIRAT, V. Enfoques moleculares para el diagnóstico en laboratorio de la infección persistente con el virus de la fiebre aftosa. /Molecular approaches to laboratory diagnosis of persistent foot-and-mouth disease virus infection. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 59:153-177, 1993.
6. BIRNBOIM, H.C. DOLLY, J.A. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 7:1513-1518, 1979.
7. BURROWS, R. Studies on the carrier state of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *J. Hyg.*, 64:81-90, 1966.
8. COWAN, K.M., GRAVES, J.H. A third antigenic component associated with FMD infection. *Virology*, 30:528-540, 1966.

9. DAWE, P.S., PINTO, A.A. Antibody response to type specific and "virus infection associated" (VIA) antigens in cattle vaccinated with inactivated polyvalent FMD virus in Northern Malawi. *Br. Vet. J.*, 134:504-511, 1978.
10. DE LA TORRE, J.C., DAVILA, M., SOBRINO, F., ORTIN, J., DOMINGO, E. Establishment of cell lines persistently infected with foot-and-mouth disease virus. *Virology*, 145:24-35, 1985.
11. EPIFANOV, G.F., SHALASHOV, L.V. Duration of retention of virus in the blood of animals which have recovered from foot-and-mouth disease. *Veterinariya, Moscow*, 3:34-35, 1968.
12. GEBAUER, F., DE LA TORRE, J.C., GOMES, I., MATEU, M.G., BARAHONA, H., TIRABOSCHI, B., BERGMANN, I., AUGÉ DE MELLO, P., DOMINGO, E. Rapid selection of genetic and antigenic variants of foot-and-mouth disease virus during persistence in cattle. *J. Virol.*, 62:2041-2049, 1988.
13. HEDGER, R.S. The isolation and characterization of foot-and-mouth disease virus from clinically normal herds of cattle in Botswana. *J. Hyg.*, 66:27-36, 1968.
14. KAADEN, O.R., EISSNER, G., BÖHM, H.O. Untersuchungen über Maul- und Klauenseuche (MKS)-Virusdauerasscheider bei vakzinierten und experimentell infizierten Rindern. *Zbl. Vet. Med. B.*, 17:485-496, 1970.
15. LEEUW, P.W., VAN BEKKUM, J.G., TIESSINK, J.W.A. Excretion of foot-and-mouth disease virus in esophageal-pharyngeal fluid and milk of cattle after intranasal infection. *J. Hyg.*, 81:415, 1978.
16. LOBO, C.A., HANSON, R.P., GUTIÉRREZ, A., BELTRAN, L.E. Serological detection of natural FMD infection in cattle and pigs. *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 85:1075-1104, 1976.
17. McVICAR, J.W., SUTMÖLLER, P. FMD: The agar gel diffusion precipitin test for antibody to virus-infection associated (VIA) antigen as a tool for epizootologic surveys. *Am. J. Epidemiol.*, 92:273-278, 1970.
18. MacDONALD, R.J., SWIFT, G.H., PRZYBYLA, A.E., CHIRGWIN, J.M. Isolation of RNA using guanidinium salts. *Methods in Enzymology*, 152:224-227, 1987.
19. MALIRAT, V., AUGÉ DE MELLO, P., TIRABOSCHI, B., BECK, E., GOMES, I., BERGMANN, I.E. Genetic variation of foot-and-mouth disease virus during persistent infection in cattle. *Virus Research*, 34:31-48, 1994.
20. MARTINEZ-SALAS, E., ORTIN, J., DOMINGO, E. Sequence of the viral replicase gene from foot-and-mouth disease virus C1-Santa Pau (C-S8). *Gene*, 35:55-61, 1985.
21. MEINKOTH, J., WALL, G. Hybridization of nucleic acids immunobilized on solid supports. *Anal. Biochem.*, 138:267-284, 1984.
22. NEITZERT, E., BECK, E., AUGÉ DE MELLO, P., GOMES, I., BERGMANN, I.E. Expression of the aphthovirus RNA polymerase gene in *Escherichia coli* and its use together with other bioengineered nonstructural antigens in detection of late persistent infections. *Virology*, 184:799-804, 1991.
23. PINTO, A.A., GARLAND, A.J.M. Immune response to virus-infection-associated (VIA) antigen in cattle repeatedly vaccinated with foot-and-mouth disease virus inactivated by formalin or acetyleneimine. *J. Hyg.*, 82:41-50, 1979.
24. ROSSI, M.S., SADIR, A.M., SCHUDEL, A.A., PALMA, E.L. Detection of foot-and-mouth disease virus with DNA probes in bovine esophageal-pharyngeal fluids. *Arch. Virol.*, 99:67-74, 1988.
25. STRAVER, P.J., VAN BEKKUM, J.G. Plaque production by carrier strains of foot-and-mouth disease virus in BHK monolayers incubated at different temperatures. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 37:12-18, 1972.
26. SUTMÖLLER, P., COTTRAL, G.E. Improved techniques for the detection of FMDV in carrier cattle. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 21 (2):170-177, 1967.
27. SUTMÖLLER, P., GAGGERO, A. Foot-and-mouth disease carriers. *Vet. Rec.*, 77:968-969, 1965.
28. SUTMÖLLER, P., McVICAR, J.W., COTTRAL, G.E. The epizootological importance of foot-and-mouth disease carriers. I. Experimentally produced foot-and-mouth disease carriers in susceptible and immune cattle. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 23:227-235, 1968.
29. VAN BEKKUM, J.G., FRENKEL, H.S., FREDERIKS, H.H.J., FRENKEL, S. Observation on the carrier state of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *Tijdschr. Diergeneesk.*, 84:1159-1164, 19359.
30. WALDMANN, O., TRAUTWEIN, K., PYL, F. Die persistenz des maul und klauenseuche virus im korper durch geseuchter tiere und seine ausecheidung. *Zentralblattf. Bakt. Par. U. Infektr.*, 121:19-32, 1931.