

Diseño de oligonucleótidos sonda para la detección de virus de interés en biodefensa

González-López, L.¹, Peraile Muñoz, I.², Rozas Sanz, G.¹, Cabria Ramos, J. C.^{1a}, Lorenzo Lozano, P.¹

Sanidad mil. 2018; 74 (3): 151-157, ISSN: 1887-8571

RESUMEN

Antecedentes: Los virus causan enfermedades en el hombre como la gripe, la rabia, la fiebre amarilla o la fiebre hemorrágica. Además, presentan características como alta variabilidad genética, virulencia y fácil transmisión y producción con infraestructuras mínimas, lo que les convierte en un problema de salud pública y de bioseguridad. Por todo ello, desarrollar sistemas de biodetección precisos y versátiles es un reto ante el cual, la tecnología de micromatrices de ADN, se presenta como un sistema de ideal. **Objetivos:** Diseño de oligonucleótidos sonda para la detección de especies pertenecientes a nueve familias de virus de interés en biodefensa. **Material y Métodos:** Se seleccionaron familias de virus de interés en biodefensa, se buscaron los genomas completos de los virus de referencia de cada una de ellas en las bases de datos (GenBank) y se identificaron fragmentos de 60 nucleótidos que cumplieran determinados condicionantes estructurales, evaluándose con BLASTN su capacidad de hibridación cruzada. **Resultados:** Se obtuvieron los genomas de referencia de virus pertenecientes a nueve familias. Se diseñaron un total de 54 nucleótidos sonda, seis de ellos correspondientes al virus de la gripe A tipo H1N1 y se clasificaron las secuencias según su índice de identidad, permitiendo predecir la capacidad diagnóstica de las sondas diseñadas. **Conclusiones:** Se han encontrado secuencias suficientes para identificar nueve familias de virus, de interés en la biodefensa, mediante la tecnología de hibridación de micromatrices de ADN.

PALABRAS CLAVE: Micromatriz, Sonda, Virus, ADN, ARN, BLASTN.

Oligonucleotide probes design for the detection of interesting in biodefense viruses

SUMMARY: Background: Viruses cause human diseases such as influenza, rage, yellow fever and hemorrhagic fever. In addition, they have characteristics such as high genetic variability, virulence and easy transmission and production with minimum level of infrastructure, which make them not only a public health but also a biosecurity problem. Therefore, the development of accurate and versatile biodetection systems is a challenge in which DNA microarray technology is released as an ideal system. **Objectives:** Probe design for virus detection by microarray technology. **Materials and Methods:** Virus families with interest in biodefense were selected and the complete genomes of the reference viruses were searched in the databases (GenBank). Fragments of 60 nucleotides with some specific physical characteristics were identified. Finally, cross-hybridization capacity was also evaluated with BLASTN software. **Results:** Viral genomes from nine families were obtained. A total of 54 probe nucleotides were designed, six of them corresponding to influenza A type H1N1 virus and the sequences were classified according to their identity index, allowing to predict the diagnostic capacity of the designed probes. **Conclusion:** It has been found enough sequences to identify nine virus families with interest in biodefense by means of the DNA microarray technology.

KEY WORDS: Microarrays, Probe, Virus, DNA, RNA, BLASTN.

INTRODUCCIÓN

Los virus son partículas infecciosas acelulares que requieren para su replicación las maquinarias celulares básicas de la célula hospedadora, constituyendo, por tanto, partículas parasita-

rias. Estos virus causan enfermedades como la gripe, la rabia, la fiebre amarilla o la fiebre hemorrágica¹. Además, presentan otras características como su alta virulencia, inmunidad no generalizada y fácil transmisión y producción con infraestructuras mínimas, lo que les convierte en un problema de salud pública y de bioseguridad, pudiendo ser manipulados para su uso como agentes de guerra biológicos^{1,2}. Respecto a esto, la peculiaridad de explotar mecanismos genéticos para crear variabilidad les otorga una mayor peligrosidad al ser agentes cambiantes, lo que implica mayor complicación a la hora de ser detectados. Un ejemplo son las epidemias estacionales causadas principalmente por el virus de la gripe A y B^{3,4}. Habitualmente, el diagnóstico clínico por infección viral se realiza en base a la sintomatología y al aislamiento de los virus a partir de fluidos vitales del individuo afectado y detección inmunológica, aunque en algunos casos se puede cultivar (y por lo tanto replicar) el virus *in vitro*, lo que facilita su identificación⁵. Sin embargo, estas técnicas consumen

¹ Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial "Esteban Terradas". Área de Defensa Biológica, Departamento de Sistemas de Defensa NBQ y Materiales Energéticos. Madrid.

² Ingeniería de Sistemas para la Defensa de España (ISDEFE). a T. Col.

Dirección para correspondencia: Paloma Lorenzo Lozano. Área de Defensa Biológica, Departamento de Sistemas de Defensa NBQ y Materiales Energéticos. Subdirección General de Sistemas Terrestres. Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial "Esteban Terradas". Ctra. M301, km 10,5, C.P. 28330, San Martín de la Vega (Madrid). Tfno. 911742367. lorenzopl@inta.es.

Recibido: 1 de marzo de 2018

Aceptado: 3 de abril de 2018

doi: 10.4321/S1887-85712018000300003

tiempo, tienen bajos niveles de sensibilidad y no siempre es posible la obtención de cultivos virales *in vitro*, por lo que se hace necesaria la aplicación de una tecnología que permita identificar el agente etiológico de la enfermedad de forma sencilla. El desarrollo de diferentes tecnologías en el ámbito de la biología molecular permite en la actualidad realizar un diagnóstico temprano y rápido de la presencia de agentes virales en muestras naturales⁶. Las metodologías basadas en la amplificación de ADN a partir de cantidades muy bajas de ADN molde (detección por la reacción en cadena de la polimerasa, PCR; del inglés, “Polymerase Chain-Reaction”) pueden no ser apropiadas en el caso de agentes virales, dado la gran variabilidad que presentan en lo referente a la naturaleza y estructura de sus genomas^{7,8}. Por todo ello, la versatilidad de la tecnología de micromatrices de ADN, capaz de crear diseños “a la carta” con nuevas sondas específicas, se presenta como un sistema de biodetección ideal para estos agentes con genomas tan variables, superando las limitaciones de las tecnologías basadas en PCR^{9,10,11}.

MATERIAL Y MÉTODOS

Elección de virus patógenicos

Se seleccionaron nueve familias de virus de interés en bio-defensa (*Arenaviridae*, *Bunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Paramyxovi-*

ridae, *Picornaviridae*, *Poxviridae*, *Rhabdoviridae*, *Togaviridae* y *Orthomyxoviridae*) cuyos integrantes presentan la mayor parte de las características de un agente de guerra biológica: alta virulencia, fácil transmisión, inmunidad no generalizada, ausencia de tratamiento efectivo y posibilidad de ser producidos y multiplicados en un laboratorio con unas infraestructuras mínimas.

Identificación de los genomas de los virus de interés

Se obtuvo la secuencia de los genomas de varias especies de las familias indicadas anteriormente en la base de datos del NCBI <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>>.

Diseño de sondas específicas para la identificación de los virus de interés

Se identificaron fragmentos de 60 nucleótidos que cumplirían determinados condicionantes estructurales, en base a parámetros físicos como el contenido en Guanina y Citosina (G+C), la temperatura de fusión (Tm; del inglés, “Temperature of melting”)¹², y la probabilidad de formar estructuras secundarias intramoleculares.

Tabla 1. Características de los genomas de los virus de interés.

Familia	Virus de referencia	Acrónimo	Cepa	Tamaño (b)	Genes	NChr ¹
<i>Arenaviridae</i>	Género <i>Arenavirus</i>					
ssRNA [-] de 10 kb de longitud, 2 cromosomas: L y S.	virus de la Coriomeningitis Linfocítica	LCM-1	Armstrong 53b	10.056	4	2
	virus Tacaribe	TCRV		10.534	4	2
<i>Bunyaviridae</i>	Género <i>Hantavirus</i>					
ssRNA [-] de 11,5 kb de longitud, 3 cromosomas: L, M y S.	virus Hantaan de la Fiebre Hemorrágica de Corea	HTNV	76-118	11.845	3	3
	Género <i>Phlebovirus</i>					
	virus de la Fiebre del Valle del Rift	RVFV	ZH-548	11.979	4	3
<i>Flaviviridae</i>	Género <i>Flavivirus</i>					
ssRNA [+].	virus del Dengue tipo 3	DENV3	D3/H/IMTSSA	10.707	1	1
	virus de la Fiebre Amarilla	YFV	cepa 17D	10.862	1	1
	virus del Nilo Occidental	WNV	956	10.962	3	1
<i>Paramyxoviridae</i>	Género <i>Paramyxoviridae</i>					
ssRNA [-] de 15-20 kb de longitud.	virus Hendra	HeV		18.234	8	1
<i>Picornaviridae</i>	Género <i>Aphthovirus</i>					
ssRNA [+] de 7,5-8,5 kb de longitud.	<i>Aftovirus</i> o virus de la Fiebre Aftosa, serotipo O	VFA	FMDV serotipo O	8.134	1	1
<i>Poxviridae</i>	Género <i>Chordopoxviridae</i>					
dsDNA de más de 150 kb de longitud.	virus Vaccinia	VACV	Western Reserve	194.711	223	1
<i>Rhabdoviridae</i>	Género <i>Tibrovirus</i>					
ssRNA [-] de 12 kb de longitud.	virus de la Estomatitis Vesicular	VEV		11.161	6	1
<i>Togaviridae</i>	Género <i>Alphavirus</i>					
ssRNA [-] de 12 kb de longitud.	virus de la Encefalomyelitis Equina Venezolana	VEE	ssp. North American	11.444	4	1
<i>Orthomyxoviridae</i>	Género <i>Influenza virus A</i>					
ssRNA [-].	Virus de la Gripe A estirpe H1N1	H1N1	A/Puerto Rico/8/34	13.588	12	8

NChr¹: número de fragmentos o cromosomas en los que se distribuye el genoma.

Diseño de oligonucleótidos sonda para la detección de virus de interés en bio-defensa

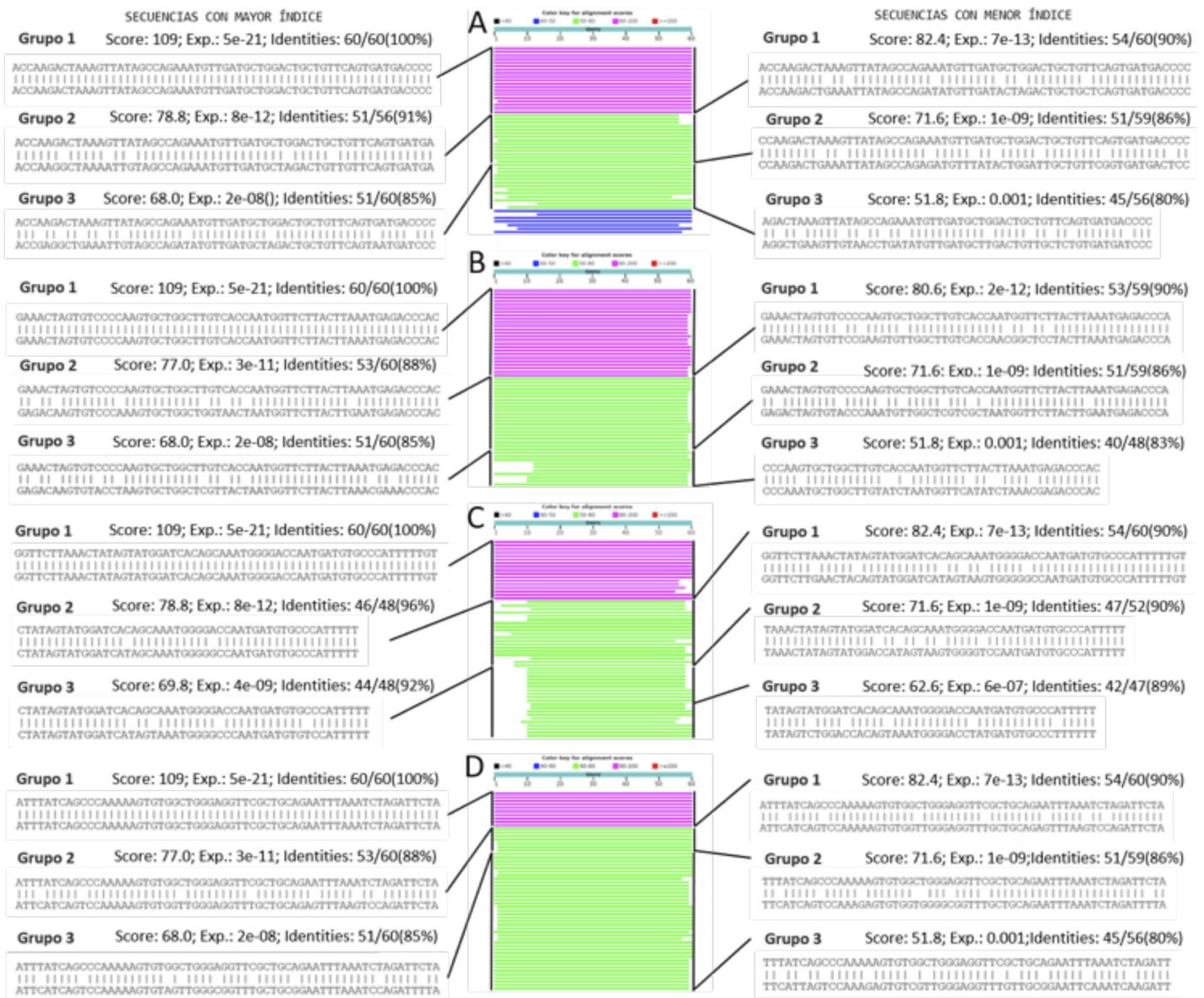


Figura 1. Similitud de secuencia entre las sondas diseñadas para LCM-1 y otras secuencias de virus de la familia Arenaviridae. A, sonda 01. B, sonda 02. C, sonda 03. D, sonda 04. A la izquierda se muestra el alineamiento entre la sonda problema (arriba) y la secuencia con mayor puntuación dentro de cada grupo (abajo); en el centro, una representación gráfica elaborada por BLASTN; y a la derecha de cada panel se muestra el alineamiento entre la sonda problema (arriba) y la secuencia con menor puntuación dentro de cada grupo (abajo). La clasificación por grupos es la siguiente: Grupo 1, secuencias con un valor S de BLASTN superior a 80; Grupo 2, secuencias con un valor S de BLASTN entre 70 y 80; Grupo 3, secuencias con un valor S de BLASTN entre 50 y 70.

Análisis de la posibilidad de hibridación cruzada de las sondas con muestras de diferentes especímenes.

Se evaluó la capacidad de hibridación de las sondas con otras muestras correspondientes a diferentes estirpes de un misma especie o a diferentes especies de la misma familia mediante un análisis BLASTN¹³ <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>> contra todas las secuencias presentes en GenBank¹⁴, de manera que las secuencias más parecidas a la de la sonda tendrán mayor probabilidad de ser detectadas de forma cruzada.

RESULTADOS

Identificación de los genomas de los virus de interés

En la actualidad hay disponibles 3.530 genomas de virus en la base de datos del NCBI. En este trabajo se han identificado los genomas de referencia de los virus pertenecientes a las familias indicadas en la Tabla 1.

Tabla 2. Secuencias y parámetros físicos de las sondas diseñadas.

Sonda	Secuencia 5'→3'	GC (%) ¹	Tm ²	Tm Adj ³	Chr ⁴
LCM-1_01	ACCAAGACTAAAGTTATAGCCAGAAATGTTGATGCTGGACTGCTGTTTCAGTGATGACCCC	45	72,1	83,7	S
LCM-1_02	GAAACTAGTGCCCCAAGTGCTGGCTTGTCACCAATGGTTCTTACTTAAATGAGACCCAC	47	72,8	84,5	S
LCM-1_03	GGTTCTTAAACTATAGTATGGATCACAGCAAATGGGGACCAATGATGTGCCATTTTTGT	40	70,1	81,6	L
LCM-1_04	ATTTATCAGCCAAAAAGTGTGGCTGGGAGGTTGCTGTCAGAAATTTAAATCTAGATTCTA	40	70,1	81,6	L
TCRV_01	CAGTGAGTTTGAATCCATCAGGTATCACTTTAGGGAGAGTGGGACATGGGATTCATGAT	45	72,1	83,7	L
TCRV_02	CACCTTCCATTTTCTCTCAAATTTCTTGGATTGACCCCTCACAAATGTTTCCAATAGTA	37	68,7	80,4	L
TCRV_03	AGGATTTCAAAAAGAGCTCAGTGAAAGAGTTAGACAATTTGCCTAGGATCCACTGTGCC	42	70,8	82,5	S
TCRV_04	CAATGCTGTCCGCAATCAGCTTAGCGTCTTTAAAAATATCTGACTTGACTGTTTGGGTGA	43	71,5	82,9	S
HTNV_01	CCAAAAGATGAAACTCTGTGCCATCTTTGACAATTTACGTTATCTTATACCTGCAGTAAC	36	68,1	79,6	L
HTNV_02	GCTGGATTGAAATGGGAAAACCAATATCCATGTATTTGTTATAAGAAGCTGTGTCTCT	35	68,0	79,6	L
HTNV_03	TGATGCATTATTCATTATGGATACTTGGAAACCAAGTATGATGGGACTGACTGGTTTTT	37	68,7	80,4	L
HTNV_04	AGGCTATACGCCAGCATGCAGAAAGCAGCTGGCTGTAGCATGATTGAAGATATTGAGTCAC	48	73,5	84,9	S
RVFV_01	ACCACAACAGGGATGATGCAGGGAATACTGCATTATACTTCTCACTATTACACACCATT	42	70,8	82,5	L
RVFV_02	TGTTGTACAATGGTTACTTTAAAAATAAAGAAGAAGAGACTGAGCCTTCGTCCCTTCT	35	68,0	79,6	L
RVFV_03	GCCTCATAGATCAGTACGTGTAAGTAATATGTTGAAATAAGTAGACACAAGCAAACCT	35	68,0	79,6	M
RVFV_04	TGCATCAAACGTTGCACCTCCACCAGCGAAGCCTTTTCAGAGACTTATTGATCTAATAGG	45	72,1	83,7	S
DENV3_01	AGCTGCGTTTACAACATGATGGGCAAGAGAGAGAAAAAACTTGGAGAGTTTGGTAAAGCA	42	70,8	82,5	1
DENV3_02	GATAATAATGGATGAGGCTCATTTCACAGACCCAGCCAGTATAGCGGTAGAGGGTACAT	47	72,8	84,5	1
DENV3_03	ACATGGGAGAAGCGGCTGCTGGTATGGCAATCAGACCCATTAATGAGAAAGAAG	47	72,8	84,5	1
DENV3_04	AAGATACCCGGAGGAGCCATGTATGCTGATGACACAGCCGGTTGGGACACAAGAATAACA	50	74,2	85,7	1
YFV_01	AAGAATGGCAATGACTGACACAACCCCTTTTGGACAGCAAAGAGTGTTTAAAGAAAAAGT	45	72,1	83,7	1
YFV_02	CGGACTTGTGTGTACAACATGATGGGAAAAGAGAGAAGAAGCTGTCAGAGTTTGGGAAA	55	76,2	87,8	1
YFV_03	GCCATATGGTATATGTGGCTGGGAGCGCGGTATCTTGAGTTTGGAGCCCTGGGATCCTG	50	74,2	85,7	1
YFV_04	GGATGACCACGGAAGACATGCTTGAGGTGTGGAACAGAGTATGGATAACCAACAACCCAC	50	74,2	85,7	1
WNV_01	TACAACATGATGGGAAAAGAGAGAGAAGAAGCCTGGAGAGTTCGGCAAAGCTAAAGGCAGC	48	73,5	84,9	1
WNV_02	TGGGATTTGTCTATCACCACAGACATATCAGAAATGGGAGCCAACTTCAAGGCGAGCAGA	47	72,8	84,5	1
WNV_03	GAAGGACTAGAGTTAGAGGAGACCCCTGCGCAAAAACACCAAAGAAACAGCATATTGA	45	72,1	83,7	1
WNV_04	AACTACAACCTGTTCAATAATGGATGAAGCCATTTTCAGGATCCAGCGAGCATCGCAGCC	50	74,2	85,7	1
HeV_01	GTAGAATTATATTGCCAGAGCCGCACATGAAATTTTAGATAATCTTTGACAGGTGCTA	37	68,7	80,4	1
HeV_02	GGTGTGTTTTTGGTTCAGAGACATTTGGTGGACGAGACAAGATCTGCTTGCAGCAATATTA	43	71,5	82,9	1
HeV_03	TGCTAAAATGACATATAAGATGCGTGCCTGTCAGGTAATTTGCTGAAGCTTTGATTGCATC	40	70,1	81,6	1
HeV_04	TTCTCCAAAAGTGAATCAAGAACCAGGCGATGCAAGCTTCTTAGATTGGGCTAGTG	45	72,1	83,7	1
VFA_01	GGACGACTTGGGCCAAAACCCAGACGGCAAAAGACTTCAAGTACTTTGCCAAAATGGTATC	50	74,2	85,7	1
VFA_02	GCCCGACCTGACACTTTGACGGTTACAATCAGCAGCCGTCGTCGTGATGGACGACTT	57	76,9	88,6	1
VFA_03	ACCCGAAAACAGCTTCTGAACCTTCGACCTCTCAAGTTGGCGGGAGACGTTGAGTCCAA	53	75,6	87	1
VFA_04	TTTTACAAACCTGTGATGGCTCGAAGACCTTCGAGGCCATCTCTCTTTGACGCGCGT	55	76,2	87,8	1
VACV_01	CTAATTCTACATATGGTGGATTGGTAATTAATATATCATGCTCAGTAATGGATATTCTG	30	66,0	77,5	1
VACV_02	AAAGGACCTAATCCATTTATCGTAAACATGCATTTGAAAAGATCTGTATTCTGTAGCGAA	35	68,0	79,6	1
VACV_03	TTTCCACATGTCATCGAAATGGTAGATATAGAACAATTTACTTTTAGTAACGTATGTGAA	30	66,0	77,5	1
VACV_04	TCGACGGAGATGAAGAATGGATGATATTGGAGCAAAATCCTAAAGCCGTAATTGAACAAA	38	69,4	80,8	1
VEV_01	GGCAGAGAGATAATATCTCCAAGACCTCTTCATCGAAGATCAAGGAGATAAACCAACTC	43	71,5	82,9	1
VEV_02	TCCCTAATGTCTTGGAAATTCGAGATACTTTGTAATTTACCGAATATTGTATAAAGACT	32	66,7	78,4	1
VEV_03	CGGCTGGATGTGTCATGCATCCTCAATGGGTACCAATGTGACTTCCAGGTGGTACGGACC	55	76,2	87,8	1
VEV_04	AAGGCTATTCAAGCAGACGGTTGGATGTGCCATGCTTCTAAATGGGTTACTACTTGCAT	45	72,1	83,7	1
H1N1_01	GCAGCGAGCCGATCGTGCCTTCTTTGACATGAGTAATGAAGGATCTTATTCTTCGGA	48	73,5	84,9	5
H1N1_02	GCAACTTATCAGAGGACAAGGGCTCTTGTTCGCACCCGGAATGGATCCCAGGATGTGCTCT	53	75,6	87	5
H1N1_03	AGGATGATGGAAAGTGCAAGACCAGAAGATGTGCTTTCCAGGGGCGGGGAGTCTTCGAG	53	75,6	87	5
H1N1_04	AGAATGTGCAACATTTCTCAAAGGGAATTTCAAAGCTGCTGCACAAAAGCAATGATGGAT	37	68,7	80,4	5
H1N1_05	TCAGTTTCTGGATGTGTTCTAATGGATCTTTCAGTGCAGAAATGCATCTGAGATTAGA	38	69,4	80,8	4
H1N1_06	TAAAAAAGTTGATGATGGATTCTGGACATTTGGACATAATGCAGAAATGTTAGTTCT	30	66,0	77,5	4

GC (%)¹ (% Guanina y Citosina), Tm² (temperatura de fusión), Tm Adj³ (temperatura de fusión ajustada en solución)¹¹, Chr⁴ (fragmento cromosómico del que deriva)

Diseño de sondas específicas para la identificación de los virus de interés

Para el diseño de las sondas se utilizó un programa informático creado por la Unidad de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), (Madrid, España). Las sondas seleccionadas para las especies pertenecientes a las familias de estudio se muestran detalladamente en la Tabla 2.

Análisis de la posibilidad de hibridación cruzada de las sondas con muestras de diferentes especímenes

El análisis BLASTN permitió determinar la similitud de secuencia entre las sondas diseñadas y todas las secuencias presentes en GenBank, de manera que las secuencias más parecidas tendrán mayor probabilidad de ser detectadas de forma cruzada. En general, se han agrupado las secuencias en tres categorías en función de su grado de homología con la sonda empleada. Ob-

Diseño de oligonucleótidos sonda para la detección de virus de interés en biodefensa

teniendo una puntuación BLASTN superior a 80 para el primer grupo de secuencias, entre 70 y 80 para el segundo grupo y entre 50 y 70 para el tercero, con índices de identidad superiores al 90%; entre 86 y 90% y entre 80 y 86% respectivamente. La clasificación de los grupos para cada una de las familias en estudio se detalla a continuación:

Familia Arenaviridae

LCM-1 (cepa Armstrong 53B)

La sonda 01, en el Grupo 1 reconoce siete estirpes o aislados diferentes de LCM-1, en el Grupo 2, 11 estirpes diferentes de LCM-1 y en el Grupo 3, secuencias de cinco aislados de LCM-1, siete estirpes del virus Junin y una estirpe de los virus Naturduori y Dandenong. La sonda 02, en el Grupo 1 reconoce secuencias pertenecientes a 11 estirpes de LCM-1, el Grupo 2 incluye secuencias de 15 cepas de LCM-1 y el Grupo 3 incluye dos estirpes de LCM-1, cinco cepas de virus Lassa y una estirpe de los virus Momeia y virus Lunk. La sonda 03 incluye en el Grupo 1, 10 variantes genotípicas de LCM-1; en el Grupo 2, 10 estirpes de LCM-1 y una cepa de virus Dandenong; y en el Grupo 3, tres cepas de LCM-1, 34 estirpes de virus Lassa, dos cepas de los virus Ippy y virus Kodoko y una cepa de los virus Lunk y virus “Merino Walk”. La sonda 04 incluye en el Grupo 1, siete genomas de LCM-1; en el Grupo 2, seis genomas de LCM-1; y en el Grupo 3, 11 estirpes de LCM-1, 11 cepas de virus Lassa virus, dos estirpes del virus Mobala y una del virus Ippy (Figura 1, Tabla 3).

TCRV

Las sondas diseñadas para este virus podrían detectar hibridación cruzada con otros virus de la misma especie, fundamentalmente virus Junin y virus Machupo y, en menor medida virus Amapari y virus Ocozocoautla de Espinosa.

Familia Bunyaviridae

HTNV (cepa 76-118)

Las secuencias devueltas por BLASTN de las cuatro sondas diseñadas para HTNV ofrecen la posibilidad de hibridar con muestras correspondientes a aproximadamente 40 virus diferentes, además de HTNV.

RVFV (cepa ZH-548)

Respecto al análisis realizado para las sondas correspondientes a RVFV, estas reconocen un número limitado de otros virus pertenecientes al mismo género. No obstante, las sondas 01 y 02, tienen un alto grado de homología con otros virus de la misma familia.

Familia Flaviviridae

El análisis de similitud entre las sondas diseñadas para DENV3 (D3/H/IMTSSA), YFV (17D) y WNV (956) y las secuencias de virus pertenecientes a esta familia reconocerán 16, 40 y 96 especies de virus diferentes con muy alta afinidad, con

Tabla 3. Similitud de secuencia entre las sondas diseñadas para LCM-1 y otras secuencias de virus de la familia Arenaviridae.

Grupo	Especie	Sonda 01	Sonda 02	Sonda 03	Sonda 04
Grupo 1	virus de la Coriomeningitis Linfocítica	7	11	10	7
Grupo 2	virus de la Coriomeningitis Linfocítica	11	15	10	6
	virus Dandenong	-	-	1	
Grupo 3	virus de la Coriomeningitis Linfocítica	5	2	3	11
	virus Dandenong	1	-	-	-
	virus Junin	7	-	-	-
	virus Naturduori	1	-	-	-
	virus Lassa	-	5	34	11
	virus Lunk	-	1	1	-
	virus Mopeia	-	1	-	-
	virus Ippy	-	-	2	1
	virus Kodoko	-	-	2	-
	virus Merino Walk	-	-	1	-
	virus Mobala	-	-	-	2

Los números indican la cantidad de estirpes correspondientes a cada uno de los virus correspondientes a cada uno de los grupos y sondas. La clasificación de los grupos es como en la Figura 1.

elevados índices de identidad y con un nivel más bajo de hibridación respectivamente.

Familia Paramyxoviridae

Todas las sondas diseñadas para HeV reconocen específicamente las 11 estirpes del mismo.

Familia Picornaviridae

El análisis de similitud entre las cuatro sondas diseñadas para el serotipo O del virus de la fiebre aftosa y las secuencias de virus pertenecientes a esta familia indica que estas reconocen diferentes estirpes de este serotipo y un buen número de cepas de los serotipos A, C y Asia y en menor medida SAT1, SAT2 y SAT3. Además, la sonda 02 tiene altos índices de identidad con secuencias de diferentes virus; entre ellos, el género enterovirus.

Familia Poxviridae

La comparación de las cuatro sondas diseñadas para VACV con las de diferentes virus pertenecientes a la misma familia indican que estas reconocerán con muy alta afinidad muestras correspondientes a los virus de la viruela humana (“variola virus”) y bovina (“cowpox virus”). Asimismo, se predice hibridación cruzada con otros virus de la misma familia, como el virus de la viruela del mono y otros virus relacionados. En cuanto a las secuencias clasificadas en los grupos 2 y 3, se pueden encontrar varios virus relacionados, causantes de enfermedades en mamíferos.

Familia Rhabdoviridae

Las sondas seleccionadas para VEV reconocerán con muy alta afinidad diferentes estirpes del mismo virus y con menos afinidad otras especies de la familia.

Familia Togaviridae

La sonda 01 de VEE” (ssp.”North American”) tiene una alta probabilidad de hibridar de forma estable con muestras procedentes de los virus de la Encefalomiélitis Equina del Este y del Oeste. Atendiendo a secuencias con un menor grado de identidad (grupos 2 y 3), las sondas diseñadas podrían detectar un buen número de virus, entre ellos el virus de la Fiebre de Chikungunya, virus Mayaro, virus Sindbis y virus del río Ross.

Familia Orthomyxoviridae

Las sondas 01 y 02 seleccionadas para la estirpe H1N1 (A/Puerto Rico/8/34) del virus de la Gripe A, formarían parte del primer grupo donde aproximadamente el 40-50% de las secuencias con mayor índice de identidad nucleotídica corresponden precisamente a los virus de la estirpe H1N1, con valor BLASTN¹⁰ mayor de 80 y que, por lo tanto, resultan prácticamente idénticas a la sonda. Por su parte, las sondas 03 y 04 tienen un amplio rango de reconocimiento de diferentes estirpes del virus de la Gripe A, ya que aproximadamente el 17% de las secuencias de mayor índice de identidad corresponden al tipo H1N1. Un porcentaje similar de secuencias corresponde al tipo N5H1, además de observar porcentajes relativamente elevados de secuencias correspondientes al resto de tipos de virus de la Gripe A. Por último, las sondas 05 y 06 tienen un patrón de reconocimiento particularmente específico de H1N1, ya que más del 75% de las secuencias corresponden a esta estirpe, mientras que el resto de estirpes virales están mucho menos representadas. En este último caso cabe destacar, además, que el número de secuencias con un índice BLASTN¹⁰ superior a 80 (Grupo 1) es bastante inferior al observado para el resto de las sondas, lo que es también indicativo de su mayor especificidad por el tipo H1N1 del virus de la Gripe A.

DISCUSIÓN

Históricamente los métodos utilizados para la detección de virus precisaban del aislamiento y cultivo *in vitro* de los mismos a partir de una muestra tomada del paciente⁵ o del uso de técnicas inmunológicas¹⁵. Estos métodos diagnósticos consumen mucho tiempo y resultan muy costosos, además no todos los virus se pueden cultivar y los inmunoensayos dependen de la calidad y disponibilidad del antisuero y de la constante evolución de los serotipos virales. Las técnicas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos son muy rápidas y sensibles⁶, pero tienen una capacidad limitada para multiplexación^{16,17}. También son altamente específicas, esto es una ventaja para detectar un virus cuya secuencia es conocida, pero una gran desventaja para el descu-

brimiento de nuevas especies, o para detectar cepas variantes de una especie conocida.

La utilización de micromatrices de ADN para la detección de virus se postula como una buena alternativa por lo que respecta al coste, tiempo de procesamiento, sensibilidad, especificidad y capacidad de detectar nuevos organismos y serotipos^{18,19,20}.

El éxito de la tecnología de hibridación de micromatrices depende de un correcto diseño de la colección de fragmentos diferentes de ADN (oligonucleótidos sonda) que se depositan sobre el soporte sólido. La utilización de secuencias altamente conservadas dentro de una misma familia, permite maximizar la probabilidad de que todos los miembros de la misma, incluidos los no secuenciados, no identificados o aquellos que hubieran evolucionado puedan ser detectados²¹. Además, debido al alto índice de variación nucleotídica que pueden presentar diferentes cepas/aislados es recomendable que las sondas diseñadas sean capaces de hibridar con el mayor número posible de estirpes pertenecientes a la misma especie. Por tanto, las matrices se deben diseñar con una combinación de sondas de alta especificidad frente a regiones conservadas, de modo que puedan usarse en modo de detección y descubrimiento²¹.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, en este trabajo se han diseñado cuatro oligonucleótidos sonda (60 nt) con una alta especificidad para 12 virus pertenecientes a las familias en estudio (*Arenaviridae*, *Bunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Paramyxoviridae*, *Picornaviridae*, *Poxviridae*, *Rhabdoviridae* y *Togaviridae*) y seis sondas correspondientes al virus de la Gripe A tipo H1N1. El análisis de las sondas diseñadas para el virus de la Gripe A (familia *Orthomyxoviridae*) muestran la posibilidad de detectar todos los tipos de virus pertenecientes a la misma especie. Además, tres sondas de tres especies de la familia *Flaviviridae* (DENV3, YFV y WNV) podrían detectar con una alta probabilidad la presencia de 16 especies de la misma familia y con una menor probabilidad, hasta 100 especies diferentes, lo que incrementa la capacidad diagnóstica de las sondas diseñadas. Este hecho es de especial relevancia si se tiene en cuenta que esta familia incluye algunos de los géneros y especies más virulentos y que, por tanto, pueden ser susceptibles de ser empleados como agentes de guerra biológica. Las sondas diseñadas para el virus Hendra (familia *Paramyxoviridae*), a diferencia de la anterior, tienen una capacidad más limitada de hibridar de forma cruzada con otras especies, si bien se podrían detectar 16 especies diferentes, algunas de ellas representadas por más de una estirpe.

El análisis de la capacidad teórica de hibridación cruzada de las sondas diseñadas en este trabajo, demuestra que todas ellas son capaces de detectar, con diferente grado de especificidad, otros virus de la misma especie o diferentes especies dentro de una misma familia. Además, la hibridación cruzada entre sondas y secuencias similares, pero no idénticas, permitiría la detección de nuevas especies siempre que estuvieran estrechamente relacionadas con las que se utilizaron para el diseño de la sonda¹¹.

En base a los resultados obtenidos se puede predecir que este nuevo diseño bioinformático de sondas, puede ser muy eficaz como una posible herramienta diagnóstica en el estudio de patogénesis virales, descubrimiento de virus en enfermedades de etiología desconocida, así como en casos de bioterrorismo^{22,23}.

AGRADECIMIENTOS

Laura González López agradece, al Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial “Esteban Terradas”, la Beca de Formación concedida (Resolución 3D0/38136/2015, de 21 de septiembre).

BIBLIOGRAFIA

1. Baños P. Terrorismo NRBQ. Visión Geopolítica analiza las posibilidades de un gran atentado nuclear, biológico, químico o radiológico, en Europa. [Internet]. [Consultado 2016 Feb 22]. Disponible en <http://www.tendencias21.net/Terrorismo-NRBQ_a42634.html>.
2. Thavaselvam D, Vijayaraghavan R. Biological warfare agents. *J Pharm Bioallied Sci* 2010;2(3):179-188.
3. Pérez Breña P. Gripe: estrategia para la prevención de un riesgo silente. *Rev Esp Quimioter* 2009; 22(1):5-6.
4. Clancy S. Genetics of the influenza virus. *Nature Education* 2008; 1(1):83.
5. Enders J. Cytopathology of virus infections: particular reference to tissue culture studies. *Annu Rev Microbiol* 1954;8:473-502
6. Zhang W, Evans D. Detection and identification of human influenza viruses by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1991;33:165-89
7. Holland J, Spindler K, Horodyski F, Grabau E, Nichol S, VandePol S. Rapid evolution of RNA genome. *Science* 1982; 215(4540):1577-85.
8. Smith DB, Inglis SC. The mutation rate and variability of eukaryotic viruses: an analytical review. *J Gen Virol* 1987;68: 2729-2740.
9. Mirski T, Bartoszcze M, Bielawska Drózd A, Gryko R, Kocik J, Niemcewicz M, *et al.* Microarrays – new possibilities for detecting biological factors hazardous for humans and animals, and for use in environmental protection. *AAEM* 2015;23(1):30-36.
10. Sultankulova KT, Kozhabergenov NS, Strochkov VM, Burashev YD, Shorayeva KA, Chervyakova OV, *et al.* New oligonucleotide microarray for rapid diagnosis of avian viral diseases. *Virol J* 2017;14(1).
11. McLoughlin KS. Microarrays for Pathogen Detection and Analysis. *Brief Funct Genomics* 2011; 10(6):342-53.
12. Wilson WD, Tanious FA, Fernandez-Saiz M, Rigl CT. Evaluation of drug-nucleic acid interactions by thermal melting curves. *Methods Mol Biol* 1997;90:219-240.
13. Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, and Miller W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences”, *J Comput Biol* 2000; 7(1-2):203-14.
14. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Ostell J, Pruitt KD, *et al.* GenBank. *Nucleic Acids Res* 2018;46(D1): D41-D47.
15. Khanna M, Kumar P, Chugh L, Prasad A, Chhabra S. Evaluation of influenza virus detection by direct enzyme immunoassay (EIA) and conventional methods in asthmatic patients. *J Commun Dis* 2001;33:163-9
16. Bej A, Mahbubani M, Miller R, Dicesare J L, Haff L, Atlas R M. Multiplex PCR amplification and immobilized capture probes for detection of bacterial pathogens and indicators in water. *Mol Cell Probes* 1990;4:353–65.
17. Vandenvelde C, Verstraete M, Van Beers D. Fast multiplex polymerase chain reaction on boiled clinical samples for rapid viral diagnosis. *J Virol Methods* 1990;30:215–27.
18. Klotchenko SA, Vasin AV, Sandybaev NT, Plotnikova MA, Chervyakova OV, Smirnova EA, *et al.* Oligonucleotide microarray for subtyping of influenza A viruses. *J Phys Conf Ser* 2012(1);345.
19. Quan P, Palacios G, Jabado OJ, Conlan S, Hirschberg DL, Pozo F, *et al.* Detection of respiratory viruses and subtype identification of influenza A viruses by greenchipresp oligonucleotide microarray. *J Clin Microbiol* 2007;45(8):2359-2364.
20. Erickson A, Fisher M, Furukawa-Stoffer T, Ambagala A, Hodko D, Pasick J, *et al.* A multiplex reverse transcription PCR and automated electronic microarray assay for detection and differentiation of seven viruses affecting swine. *Transboundary Emer Dis* 2018;65(2):272-283.
21. Wang D, Coscoy L, Zylberberg M, Avila PC, Boushey HA, Ganem D, Derisi JL. Microarray-based detection and genotyping of viral pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(24):15687-92.
22. Sergeev N, Distler M, Courtney S, Al-Khalidi SF, Volokhov D, Chizhikov V, *et al.* Multipathogen oligonucleotide microarray for environmental and biodefense applications. *Biosens Bioelectron* 2004;20(4):684-698.
23. Uttamchandani M, Neo JL, Ong BNZ, Moochhala S. Applications of microarrays in pathogen detection and biodefence. *Trends Biotechnol* 2009;27(1):53-61.