

Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
División de Ciencias Biológicas y Ambientales



“Desarrollo de la PCR en tiempo real (qPCR)
para el control de calidad de la vacuna
viral contra la enfermedad del Newcastle”

Tesis
que para obtener el título de
Licenciado en biología

Presenta

Alejandra Anahí Martínez Delgado

Directora: Dra. Argelia Esperanza Rojas Mayorquín
Asesor: Dr. Daniel Ortuño Sahagún

Zapopan, Jalisco, 7 julio 2011

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Bio-Zoo S.A. de C.V. y en el Laboratorio de Desarrollo y Regeneración Neural del Instituto de Neurobiología, del Departamento de Biología Celular y Molecular del CUCBA, bajo la Dirección de la Dra. Argelia Esperanza Rojas Mayorquín y la asesoría del Dr. Daniel Ortuño Sahagún. Es parte de los productos de un proyecto de Innovación tecnológica apoyado por el CONACYT (Registro 129167 INNOVAPYME). AAMD contó con una beca de CONACYT de dicho proyecto para el desarrollo de la presente tesis.

B1130



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología
COORD-BIO-073/2011

C.ALEJANDRA ANAHÍ MARTÍNEZ DELGADO
PRESENTE

Manifestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título: "**DESARROLLO DE LA PCR EN TIEMPO REAL (qPCR) PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE LA VACUNA VIRAL CONTRA LA ENFERMEDAD DEL NEWCASTLE**", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director de dicho trabajo a la Dra. Argelia E. Rojas Mayorquín, asesor/a interno al Dr. Daniel Ortuño Sahagún.

Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 06 de mayo de 2011.


DRA. TERESA DE JESÚS ACEVES ESQUIVIAS
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN
COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA


M.C. GLORIA PARADA BARRERA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

IESIS/CUCBA

BIBLIOTECA  REBI
RED DE BIBLIOTECAS
UNIVERSIDAD
DE GUADALAJARA

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

Inscripción: 064306

07/05/12

Donación

PTAC-064306

Nos. 373859

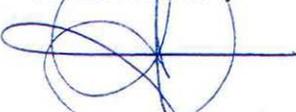
Dra. Teresa Aceves Esquivias.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Licenciatura en Biología.
 CUCBA.
 Presente

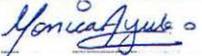
Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad **Tesis e informes**, opción **tesis** con el título: "DESARROLLO DE LA PCR EN TIEMPO REAL (qPCR) PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE LA VACUNA VIRAL CONTRA LA ENFERMEDAD DEL NEWCASTLE" que realizó la pasante C. **Alejandra Anahí Martínez Delgado** con número de código **303015734** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente
 Las Agujas, Zapopan, Jal., 8 de junio del 2011


 Dra. Argelia E. Rojas Mayorquín
 Directora del trabajo


 Dr. Daniel Ortuño Sahagún
 Asesor

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dra. Luz Patricia Castro Félix		8-6-2011
Dra. Anne Marguerite Helene Santerre		8-06-2011
M en C. Verónica Palomera Ávalos		8-06-2011
Supl. Dra. Mónica Ayub Ayala		8-06-2011

Vo. Bo.
 23/06/2011

A quién me regaló un libro y me enseñó la aventura de leer...
A quién nunca le faltó una palabra, un regalo, consejo o regaño...
A quién no creía como a quién creía en mí...
A quién me acompañó eternamente en mis caídas, con molesta insistencia...
A quién me acompañó, desveló y divirtió conmigo en este difícil camino...
A todos con quien he compartido estos años mis hermanos y amigos...
Y a quien me dio la vida y me enseñó con su ejemplo a no morir en el intento de vivirla...
Al Dios, no en el que creo sino el que cree en mí...
Un poco de lo que me han dado...
de quién les agradece y debe más que una tesis..para ustedes

GRACIAS



Contenido

Agradecimientos	7
Abreviaturas	9
Resumen	11
Introducción	13
Antecedentes	15
Enfermedad de Newcastle	15
Clasificación y características del NDV.	16
Estructura del virus de la enfermedad de Newcastle.	16
Elaboración de vacunas y control de calidad	17
PCR convencional.	19
PCR en tiempo real	20
Planteamiento del problema	23
Justificación	25
Hipótesis	27
Objetivos	29
Objetivo General	29
Objetivos específicos	29
Diseño experimental	31
Material y métodos	33
Diseño de oligonucleótidos	33
Extracción de RNA viral a partir de cosechas virales	34
Síntesis de cDNA	35

PCR en gradiente de temperaturas	36
qPCR	36
Resultados.	39
Diseño de los oligonucleótidos	39
Extracción y purificación de RNA viral.	39
Síntesis de cDNA	40
PCR convencional.	40
qPCR	40
Discusión	49
Conclusiones.	51
Referencias	53
Índice de figuras y tablas	55

Agradecimientos

Al Doctor Daniel Ortuño Sahagún por su confianza y su oportuna invitación al mundo de la ciencia, sobre todo por el constante apoyo y dirección a lo largo de este tiempo. Sin su notable participación en mi carrera universitaria no estaría ni siquiera iniciada ésta tesis que es para usted. Gracias...

A la Doctora Argelia Rojas Mayorquín, por su infinita paciencia para enseñarme cada uno de los conocimientos sin los cuales no estaría hecha esta tesis. Por su asesoría y por ser una guía de la que nunca faltó un consejo en este camino de la ciencia. También por su ejemplo, apoyo, compañerismo y mucho aliento sin el cual, tampoco estaría ésta tesis, Elaiza Gracias...

A Gloria Delgado, mi madre y la mujer que más me ha enseñado, desde que abrí los ojos con su ejemplo me ha inspirado a ser fuerte y valiente, a la que le debo tanto, que necesito más que palabras para expresar lo que he aprendido, por qué sin ti ni ésta tesis, ni yo...Gracias.

A mi *alma mater*, mi UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA de la que orgullosa me siento como una hija más, y a cada uno de sus hijos los grandes maestros que me enseñaron en cada clase la sabiduría y conocimiento que integran esta casa universitaria y que el "piensa y trabaja" es más que el compromiso de ser universitario. Gracias a todos mis profesores en este camino, y a esas mujeres de ciencia que revisaron cada detalle de mi tesis, Muchas Gracias...

A quienes no dejaron de creer en mí, ni de sostenerme y acompañarme cada minuto, a todo el apoyo técnico, motivacional y financiero para escribir esta tesis... los que sin nombrar saben que están en estas líneas por todo eso...

GRACIAS.

Abreviaturas

μg	Microgramos
μL	Microlitros
Å	Amstrong
APMV-1	Paramixovirus aviar -1
BrEt	Bromuro de Etidio
°C	Grados centígrados
cDNA	DNA complementario
CT	Ciclo umbral (Cycle threshold)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DEPC	Dietil-pirocarbonato
Dil	Dilución
DIEP	Dosis infectante en embrión de pollo
dNTPs	Desoxinucleósidos trifosfato
et al	Del latín: et alii (y otros)
g	Gravedad
H	Hemaglutinina
h	Horas
HN	Hemaglutinina-neuraminidasa
min	Minutos
mL	Mililitros
MQ	Calidad molecular
NDV	Virus de la enfermedad del Newcastle
NP	Nucleoproteína
nm	Nanómetros
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RNA	Ácido ribonucleico
RNA (-)	Cadena de RNA de polaridad negativa en sentido no traduccional
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos

Resumen

La elaboración de vacunas es muy importante para la prevención de las enfermedades que provocan grandes pérdidas en determinadas poblaciones, como las ocasionadas por el virus de la enfermedad de Newcastle, que infecta a las aves y ocasiona un grave impacto en la producción alimentaria.

El control de calidad de una vacuna se realiza por lo menos en dos ocasiones durante su preparación, con el fin de evaluar su inocuidad, presencia y cantidad del virus mediante técnicas que tardan alrededor de 7 a 14 días.

En el presente trabajo se desarrolló la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) para la amplificación de un fragmento de 281 pb perteneciente al *Paramixovirus aviar 1* causante de la enfermedad de Newcastle, con el fin de realizar la identificación específica del virus, así como de optimizar el tiempo de titulación y cuantificación del virus para el control de calidad en cosechas de producción.

Se estandarizó la técnica determinando los parámetros en cada uno de los procedimientos, desde la extracción de RNA viral, la síntesis del cDNA, la amplificación mediante PCR convencional para finalmente realizar la amplificación por qPCR con el agente intercalante EvaGreen. La amplificación del fragmento viral por qPCR se logró a una temperatura óptima de 62.9°C.

En cada uno de los procedimientos se evaluó la integridad de los fragmentos amplificados mediante electroforesis y espectrofotometría, y finalmente con las gráficas proporcionadas por el programa del termociclador de tiempo real se demostró que hubo amplificación específica del fragmento deseado.

La presente tesis aporta la información necesaria para la amplificación específica y cuantificación del genoma del NDV presente en las muestras tanto de cosechas virales como de vacunas elaboradas.

Introducción

En las empresas dedicadas al mantenimiento de la salud animal es importante establecer controles de calidad que garanticen la eficiencia en la fabricación de productos como las vacunas, las cuales tienen como objetivo prevenir las enfermedades causadas por diversos patógenos como los virus, que afectan en gran medida al sector alimentario. Es el caso del paramixovirus aviar, causante de la enfermedad de Newcastle que provoca cuantiosas pérdidas en las producciones avícolas (Al-garib et al., 2003).

El antígeno contenido en una vacuna induce una respuesta inmune, formando con ello una población de células de memoria inmunológica, las cuales causarán una reacción inmune secundaria al producirse una nueva exposición ante el mismo antígeno. Las vacunas pueden ser elaboradas con virus íntegros, atenuados o inactivos (Roitt et al., 2000).

Las vacunas contra la enfermedad de Newcastle para aves de corral, son elaboradas a partir de virus íntegros o inactivos; se formulan a partir de cepas de baja virulencia (lentogénicas) o de virulencia moderada (mesogénicas). Las cepas lentogénicas empleadas en las vacunas virales son: Hitchner-B1, La sota, V4, NDW, 12 y F. Las cepas mesogénicas son Roakin, Meekteswar y Komarov (Alexander, 1988).

Para la elaboración de una vacuna se deben cumplir estrictos controles de calidad en cada una de sus etapas antes de ponerla a la venta, desde la selección del inóculo y su cultivo, hasta la validación del producto donde se realizan diversas pruebas que tardan alrededor de una semana, con el fin de verificar la integridad e infectividad del virus en cada lote de la vacuna (Belak y Thoren, 2003).

Para el mejoramiento de los procesos de control de calidad, así como para la reducción del tiempo de validación, algunas empresas han implementado técnicas de biología molecular, como son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) y la PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR, del inglés *quantitative Polymerase Chain Reaction*) para la detección y cuantificación de agentes infecciosos.

La PCR convencional es una técnica que permite la amplificación *in vitro* de un segmento específico de cualquier genoma mediante la reacción en cadena de una polimerasa de DNA termoestable. Después de la amplificación, se requiere realizar la detección de los fragmentos amplificados mediante una electroforesis en un gel de agarosa.

La PCR en tiempo real, por otro lado, amplifica al mismo tiempo que detecta los productos amplificados sin necesidad de realizar una electroforesis, lo que la hace una técnica conveniente para los procedimientos de control de calidad en la elaboración de la vacuna viral contra la enfermedad de Newcastle.

Antecedentes

Enfermedad de Newcastle

La enfermedad de Newcastle, también conocida como neumoencefalitis aviar, es una infección de las aves, tanto domésticas como silvestres, causada por un virus de la familia Paramyxoviridae, el cual presenta una gran variación en cuanto a su virulencia, dependiendo de las condiciones propias del animal infectado, así como de los factores ambientales en que éste se encuentre (Alexander y Allan, 1974). La enfermedad causa diferentes cuadros clínicos, que van desde infecciones de las vías respiratorias, daño neurológico, hemorragias en el intestino, hasta la disminución de la puesta de huevos en las gallinas (Pham et al., 2005). Con base en los signos clínicos que se puedan presentar, la enfermedad se clasifica en diferentes tipos patológicos (tabla 1).

Tabla 1
Clasificación de la enfermedad de Newcastle

<i>Tipos patológicos</i>	<i>Alteraciones clínicas</i>
Velogénico - viscerotrópico	Muy patogénica, se observan lesiones intestinales hemorrágicas.
Velogénico neurotrópico	Mortalidad elevada, congestión de la mucosa traqueal, signos respiratorios y nerviosos.
Mesogénico	Signos nerviosos y respiratorios pero de baja mortalidad.
Lentogénico o respiratorio	Con infección respiratoria leve o subclínica.
Entérico o asintomático	Infección entérica subclínica.

Se tiene conocimiento de la enfermedad del Newcastle a partir de una serie de epidemias que se presentaron en 1926 en Java, Inglaterra y en Corea. La principal distribución del virus se dió a lo largo de la costa norte de Inglaterra, alrededor de la ciudad de Newcastle, de ahí el nombre de virus de la enfermedad de Newcastle (NDV, del inglés *Newcastle disease virus*). Fue aproximadamente en el año de 1950 cuando se reconoció en México por primera vez; causó alta mortalidad y grandes pérdidas económicas y sanitarias, es una de las principales enfermedades de mayor impacto en la industria avícola mexicana (Moreno-Chan, 1994).

El NDV también puede causar zoonosis, ya que puede provocar infecciones virales en el humano que se limitan a síntomas gripales o conjuntivitis; en la mayoría de los casos se

debe al contacto accidental en el laboratorio o a la manipulación de aves enfermas (Ayllón-Barasoain, 2009).

Clasificación y características del NDV

La clasificación taxonómica del virus de la enfermedad de Newcastle lo agrupa dentro de la familia Paramyxoviridae, en el orden de los mononegavirales del género Avulavirus (Comité internacional de taxonomía de virus).

Los paramixovirus aviares incluyen 9 grupos de virus serológicamente distintos con diferentes hospederos primarios, designados desde paramixovirus 1 (por sus siglas en inglés APMV-1) hasta el paramixovirus 9 (APMV-9). El virus que causa la enfermedad de Newcastle es el APMV-1 (Moreno-Chan, 1994).

El APMV-1 es un virus de RNA no segmentado, compuesto por 15,186 nucleótidos (Ayllón-Barasoain, 2009). Forma parte del grupo V con base en la clasificación de Baltimore que agrupa a los virus según su tipo de genoma así como la importancia del mRNA en su ciclo replicativo; este grupo corresponde a virus de RNA de cadena simple (ssRNA) con sentido negativo (Baltimore, 1971) que requieren una RNA polimerasa RNA-dependiente para producir mensajeros; emplea a los ribosomas celulares para producir la RNA replicasa y hacer múltiples copias a partir de sí mismo (Carter y Saunders, 2007).

El genoma del NDV está constituido por seis genes principales, que en secuencia 3'-5' son: NP-P-M-F-HN-L, los cuales codifican dos proteínas no estructurales W y V (Yussoff y Tan, 2001), así como las siguientes proteínas estructurales:

1. RNA polimerasa (L)
2. Proteína hemaglutinina-neuraminidasa (HN)
3. Proteína de fusión (F)
4. Proteína de matriz (M)
5. Proteína P o fosfoproteína (P)
6. Proteína de la nucleocápside o nucleoproteína (NP)

Estructura del virus de la enfermedad de Newcastle

La partícula viral mide entre 120 a 180 nm, está protegida por una cápside de simetría helicoidal (Ayllón-Barasoain, 2009). En la envoltura lipoprotéica están los componentes antigénicos que le dan la especificidad serológica al virus, ubicados en proyecciones que miden aproximadamente 80 Å. Además, está conformada por dos glicoproteínas y siete polipéptidos. Las glicoproteínas son: la HN que aglutina los glóbulos rojos y la proteína F encargada de mediar la fusión del virus a la membrana de la célula a infectar (Yussoff y Tan, 2001; Figura 1).

La HN se encarga de la unión del virus a los receptores de la célula huésped (Ayllón-Barasoain, 2009). El virus se adhiere a los receptores celulares del glóbulo rojo, produce hemoaglu-

tinación y enseguida se eluye, debido a la digestión enzimática del receptor celular por efecto de la neuraminidasa viral (Moreno-Chan, 1994).

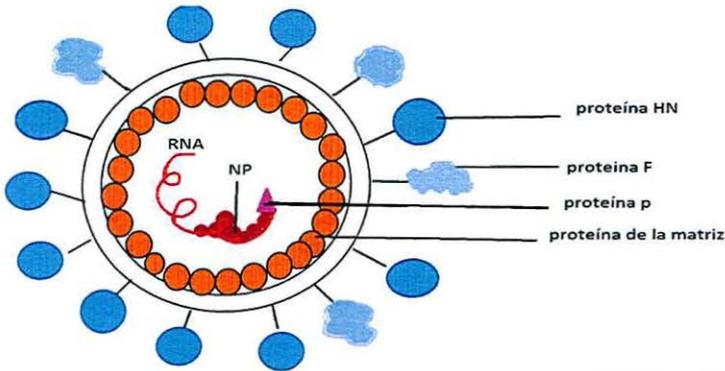


Figura 1. Esquema de la estructura del virus de la enfermedad de Newcastle

Elaboración de vacunas y control de calidad

Durante la elaboración de una vacuna se deben establecer estándares y procedimientos de control que garanticen un producto de buena calidad, con la mayor inocuidad y eficacia posible, verificando constantemente la calidad y uniformidad de la vacuna (Espeseth, 2004). Para ello, durante el proceso de elaboración, se requiere detectar y cuantificar el virus por lo menos en dos ocasiones diferentes durante el proceso antes de agregarle los reactivos estabilizadores y envasarla para su posterior distribución y venta.

En trabajos previos se ha publicado que la detección, determinación e infectividad del NDV, se llevan a cabo mediante el aislamiento del virus *in vivo* en embriones de pollo. Dichos procedimientos son muy prolongados, debido al tiempo de incubación de los embriones. Algunas pruebas que se realizan son: el índice de patogenicidad intracerebral, en pollos con un día de edad; el índice de patogenicidad intravenosa, en pollos con 6 semanas de edad; y la prueba del tiempo medio de muerte, realizada en embriones (Pham et al., 2005).

La titulación del virus se realiza a partir de huevos de aves inoculados para evaluar la dosis infectiva correcta. Dicho procedimiento implica realizar diluciones del virus inoculado en huevos de 9 a 10 días de gestación, que son incubados a 37°C durante 5 a 7 días, posteriormente se enfrían los huevos para identificar la actividad hemaglutinante, que es indicadora de la presencia del virus activo (Alexander, 1988).

Actualmente, en México existen dos Normas Oficiales que regulan los temas relacionados con la vacunación contra la enfermedad de Newcastle, la NOM-013-ZOO-1994 y la NOM-052-ZOO-1995 (consultado en el Catálogo de Normas Oficiales Mexicanas: <http://www.economia-noms.gob.mx/noms/inicio.do>). La NOM-013-ZOO-1994 establece los lineamientos

de la campaña general, para prevenir, controlar y erradicar la enfermedad de Newcastle en las aves, en sus cepas velogénicas y mesogénicas. En dicha norma se establece que la prueba diagnóstica oficial para la campaña es el aislamiento viral e identificación de cepas de la enfermedad de Newcastle; se utiliza para ello el fluido amino-alantoideo de los embriones muertos para detectar la aglutinación en placa de eritrocitos de pollo y la inhibición de la hemoaglutinación por un suero monoespecífico. Además de este procedimiento, la NOM establece que la caracterización de la cepa del virus se realice inoculando embriones de pollo a diferentes horas y registrando posteriormente la mortalidad embrionaria. De acuerdo a ello se establece la cepa viral como se indica en la tabla 2.

Tabla 2
Clasificación de la cepa viral por mortalidad embrionaria

<i>Tiempo de mortalidad</i>	<i>Interpretación de la cepa de virus de newcastle</i>
Menos de 60 horas	Velogénico
De 60 a 90 horas	Mesogénico
Más de 90 horas	Lentogénico

Como puede observarse en la tabla 2, el tiempo requerido en la metodología diagnóstica es de hasta 4 días posteriores a la inoculación del embrión.

Después de diagnosticado el virus, según la NOM es necesario tomar varias medidas precautorias relacionadas con el sacrificio de las aves y la desinfección de las instalaciones para inactivar el virus, por lo que es de vital importancia realizar un diagnóstico oportuno con una prueba eficiente y rápida. En este aspecto, las metodologías moleculares son una opción eficiente.

La NOM-052-ZOO-1995 establece los requisitos mínimos para las vacunas empleadas en la prevención y control de la enfermedad de Newcastle. Ésta NOM especifica que las vacunas pueden ser de virus activos o inactivados con productos químicos (ej. formol) y pueden encontrarse en dos presentaciones, liofilizadas o congeladas. Las vacunas deben elaborarse en embriones de pollo o en cultivos celulares. Se indican además, las pruebas que deben realizarse tanto a las vacunas como a las semillas de trabajo (los virus puros a partir de los cuales se elaboran las vacunas). Estas pruebas y los tiempos aproximados de realización se describen a continuación:

- a) *Verificación de la patogenicidad embrionaria del virus.* Inoculación del virus en embriones y registro de la muerte de los mismos. La muerte de los embriones deberá de ocurrir después de las 120 horas post-inoculación; enseguida se procede a realizar pruebas de hemoaglutinación para la titulación viral utilizando el fluido alantoideo obtenido.
- b) *Prueba de pureza.* Consiste en determinar que la semilla de trabajo esté libre de contaminantes, sales antibióticas y otros compuestos conservantes como el timerosal. Para ello se realiza un análisis bacteriológico cuantitativo utilizando diferentes medios de cultivo. lo que tarda varias semanas de elaboración.
- c) *Prueba de seguridad o inocuidad.* Inoculación en pollos, vía intraocular, con dosis de semilla de trabajo o de la vacuna, en una dilución equivalente a 10 dosis de la vacuna terminada,

posteriormente se mantienen en observación durante 21 días para registrar posibles reacciones adversas.

- d) *Prueba de titulación.* Se realiza mediante varias diluciones seriadas del producto terminado en medio de cultivo, mismas que serán inoculadas en la cavidad coriónica de embriones de pollo (al menos 6 huevos embrionados por cada dilución). Los embriones se observan diariamente hasta por 5 días. Una vez concluido este tiempo se examina el líquido alantoideo de cada embrión por medio de la prueba directa de hemaglutinación en placa. La vacuna debe presentar un título mínimo de 10^7 DIEP 50% por cada mL de virus de la enfermedad de Newcastle. Así mismo se establece que la semilla de trabajo deberá contener un título mínimo de 10^9 DIEP 50%/mL de virus de la enfermedad de Newcastle para ser adecuada para la elaboración de la vacuna.
- e) *Prueba de potencia.* Desafío de la semilla de trabajo y vacuna (inoculación del virus por vía intramuscular) en pollos después de 15 a 21 días de haber sido vacunados. Los animales deben ser observados por 14 días. La prueba se considerará satisfactoria, cuando el 90% de los animales vacunados con la semilla de trabajo permanezcan vivos y sin signos de la enfermedad.

PCR convencional

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR convencional es una técnica de biología molecular que se basa en la amplificación específica *in vitro* de un segmento de DNA. Se utiliza una polimerasa termoestable guiada por dos cebadores mediante ciclos de temperatura distinta, para concluir con la síntesis de la secuencia genómica elegida. Básicamente la técnica de PCR consiste en tres etapas: a) desnaturalización de las cadenas de ácido nucleico, b) alineación específica de los cebadores, y c) extensión del DNA (Delidow et al., 1993).

La PCR nos permite seleccionar, además de copiar múltiples veces un segmento específico del genoma (que en este caso es viral) por medio de cebadores previamente diseñados, los cuales se unirán a una secuencia específica del virus del Newcastle si la muestra contiene dichas secuencias en su genoma (figura 2). La técnica de PCR tiene gran importancia en diversas áreas, se ha implementado su uso en el diagnóstico clínico para la detección de diversos patógenos (Sachse y Frey, 2002).

Posteriormente a la amplificación del material genómico, es necesario detectar los fragmentos amplificados, así como realizar una evaluación cualitativa y cuantitativa del material obtenido, con técnicas que van desde la separación de fragmentos del DNA por electroforesis en gel de agarosa y tinción con agentes intercalantes de ácidos nucleicos (por ejemplo con bromuro de etidio - BrEt), hasta la determinación de su pureza mediante espectrofotometría (Costa, 2004). Dichos procedimientos pueden representar un inconveniente, ya que requieren de cierto tiempo para el análisis y sólo nos permiten visualizar el producto final de la amplificación, sin conocer la progresión de la misma.

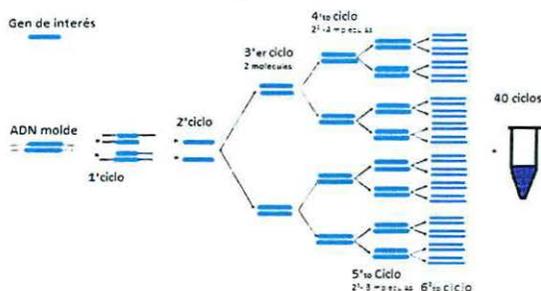


Figura 2. Amplificación por PCR convencional

PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR) es una técnica derivada de la PCR convencional; esta metodología es útil en virología, ya que es una alternativa al aislamiento por cultivo celular. Ésta técnica además de amplificar los fragmentos de interés, monitorea cada producto amplificado durante la fase exponencial, lo que facilita la cuantificación posterior. El empleo de la qPCR no requiere realizar análisis posteriores por electroforesis o medición por espectrofotometría (Costa, 2004).

La detección de la amplificación se realiza por medio de una señal fluorescente que emiten agentes intercalantes del DNA añadidos a la reacción de amplificación, los cuales pueden ser moléculas específicas (sondas Taqman) o fluoróforos no específicos que se unen al surco menor del DNA, permitiendo al láser del termociclador identificar la cantidad de copias generadas en cada ciclo. El termociclador cuenta con sensores que, después de excitar al fluoróforo con una longitud de onda apropiada, miden la fluorescencia al mismo tiempo que la tasa de amplificación (Costa, 2004).

La PCR en tiempo real utiliza también dos cebadores para la detección y amplificación del fragmento de interés; el riesgo de contaminación de las muestras puede ser menor si se trabaja con precaución debido a que las manipulaciones son menores. También se puede emplear una placa de titulación con múltiples pocillos que permite automatizar el procedimiento. En la tabla 3 se muestran las principales diferencias entre las técnicas de PCR y qPCR.

El análisis de los productos de qPCR se basa en gráficas y valores que proporciona el programa comercial del equipo que se utilice, el cual permite un seguimiento preciso de cada ciclo. Algunos trabajos publicados muestran que la qPCR tiene una sensibilidad 100 veces mayor a la PCR convencional (Pham et al., 2005).

Tabla 3
Comparación entre PCR convencional y PCR tiempo real

Técnica	Características
PCR convencional	<ul style="list-style-type: none"> -Tiempo de amplificación: más de 3 horas. -Requiere realizar posterior detección de productos de PCR. -Requiere análisis cualitativos y cuantitativos, posteriores a la amplificación. -Se manejan sustancias peligrosas y mutagénicas como el BrEt para tinción de gel.
PCR tiempo real	<ul style="list-style-type: none"> -La amplificación se realiza en menos de dos horas. -Amplifica y detecta simultáneamente los productos de la amplificación. -Se evita el uso de BrEt. -Disminuye los tiempos de amplificación y análisis de resultados.

Se realizan tres tipos principales de análisis con los datos y gráficas obtenidas por la qPCR:

- 1) *Medición del valor del ciclo umbral (CT)*. El cual representa el número de ciclos en que la fluorescencia de los productos amplificados alcanza una significancia por encima del ruido de fondo (Saunders, 2004; figura 3).

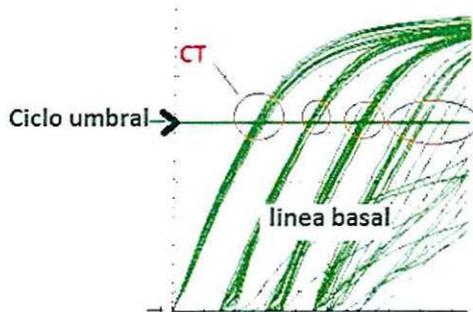


Figura 3. Medición del Ciclo umbral

- 2) *Verificación de los fragmentos obtenidos mediante análisis de las gráficas obtenidas*. La curva de fusión (*melt curve*) se obtiene mediante el aumento de la temperatura hasta el punto de fusión, donde se separan las cadenas de DNA y por consecuencia la fluorescencia disminuye bruscamente. La gráfica del pico de disociación (*melt peak*) indica un pico por cada concentración de los fragmentos amplificados, siendo el pico más alto la muestra donde hubo mayor número de fragmentos amplificados. Estas gráficas demuestran la especificidad de los productos amplificados (Bustin, 2005; figura 4).

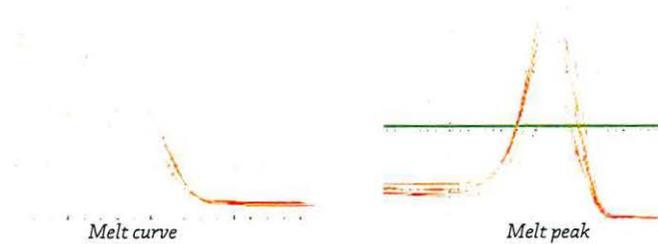


Figura 4. Curva de fusión y pico de disociación.

- 3) *Cuantificación y estimado del número de copias obtenidas.* Si se parte de que, en teoría, con una eficiencia de amplificación de 100% se duplica el número de copias por cada ciclo de amplificación, es posible calcular el número de copias obtenidas mediante una cuantificación relativa (Kubista et al., 2006). Tomando en cuenta que la plantilla de cDNA muestra un incremento uniforme en la fluorescencia, entonces se puede estimar el número de copias de manera sencilla utilizando el fluoróforo EvaGreen.

Planteamiento del problema

Las empresas veterinarias están obligadas a garantizar la efectividad de las vacunas que elaboran antes de que salgan a la venta. Con el fin de asegurar su adecuada preparación que brinde la protección deseada se requiere de la implementación de sistemas de calidad, que validen el proceso de elaboración del producto final.

En la vacuna ya procesada se deben evaluar diversos parámetros, como la concentración de partículas virales y la potencia de infectividad, para lo cual se requiere realizar la detección, además de la cuantificación del virus, por medio de técnicas poco específicas que pueden prolongarse durante varios días.

En el presente trabajo se desarrolló la técnica de qPCR como alternativa a los métodos convencionales de cuantificación empleados en el control de calidad durante la elaboración de vacunas virales.

Justificación

El empleo de la técnica de PCR en tiempo real durante la elaboración de vacunas virales contra la enfermedad del Newcastle permitirá optimizar los procesos de control de calidad en la producción de vacunas y disminuirá no solo los recursos requeridos sino además el tiempo empleado en la detección y cuantificación del NDV.

La agilización de los procesos de validación de la vacuna por medio de metodologías moleculares contribuirá a su mejoramiento, garantizando a su vez la calidad de la elaboración. Se evitarán procedimientos como el cultivo celular y también se podrá prescindir de las evaluaciones mediante electroforesis en geles de agarosa o espectrofotometría.

La técnica de qPCR puede también ser empleada en el diagnóstico clínico para una detección rápida del patógeno, lo cual permitiría que se inicie el tratamiento de manera rápida. Con la PCR en tiempo real se logra simultáneamente la amplificación y la cuantificación de los productos amplificados en caso de la presencia del virus.

Por otro lado, a fin de que una técnica sea llevada a escala industrial en los procedimientos rutinarios de una empresa debe ser previamente estandarizada y evaluada para así poder establecer cada una de las condiciones que se deben seguir en su correcta utilización. Una vez estandarizada la técnica se podrá reproducir siguiendo las condiciones previamente establecidas en el laboratorio con la seguridad de obtener un resultado exitoso.

Hipótesis

La técnica de PCR en tiempo real (q-PCR) es factible como procedimiento rutinario en el control de calidad para la detección y cuantificación del virus de la enfermedad de Newcastle.

Objetivos

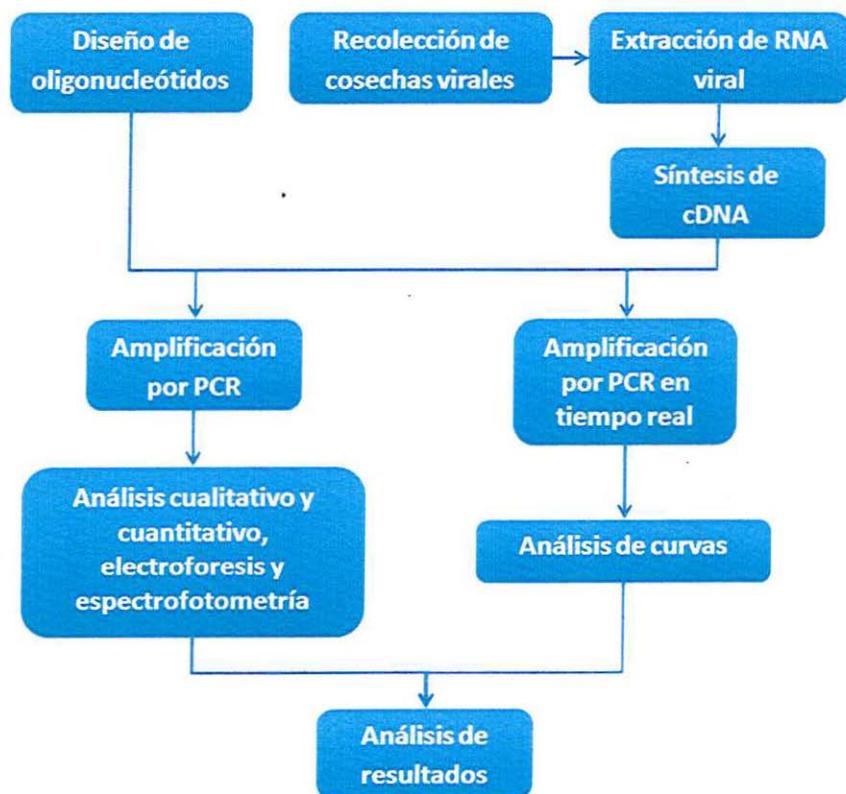
Objetivo General

Desarrollar y estandarizar la técnica de PCR en tiempo real para la detección y cuantificación del APMV-1 que ocasiona la enfermedad de Newcastle.

Objetivos específicos

- Diseñar los oligonucleótidos específicos para la detección del APMV-1.
- Establecer los parámetros y condiciones de cada etapa del proceso de amplificación para optimizar el empleo de la técnica de PCR convencional.
- Establecer los parámetros y condiciones de cada etapa del proceso de amplificación para optimizar el empleo de la técnica de qPCR.

Diseño experimental



Material y métodos

Diseño de oligonucleótidos

Para el diseño de los oligonucleótidos se siguieron las siguientes reglas generales (Dieffenbach et al., 1993):

1. Seleccionar las secuencias en las que no predominen las repeticiones de bases (poliuridinas o polipirimidinas) ya que contribuyen a la inespecificidad de la reacción; que el contenido de A-T y G-C sea del 50% aproximadamente.
2. Evitar secuencias que puedan formar estructuras secundarias entre sí, ya que podría causar una autoamplificación, comprobar que los oligonucleótidos sean complementarios al DNA molde, sobre todo al extremo 3', por ser el lugar de unión de la *Taq* polimerasa.
3. La temperatura de hibridación de los oligonucleótidos no debe diferir más de 5°C entre ambos. Además
4. Buscar, en bases de datos, que la secuencia genética del virus con la que se diseñaron los oligonucleótidos no se repita en otro lugar del genoma.

La información de la secuencia génica del NDV se consultó en la base de datos *GenBank* del NCBI (figura 5).

NCBI Resources How To

Nucleotide Search | Literature | Links: Advanced search Help

Accession: G0978777

Download Settings GetBank

Newcastle disease virus strain APMV-1/chicken/U.S.(TX)/GB/1948, complete genome
 GI: 21295683904

LOCUS G0978777 15186 bp cDNA linear VRL 28 JUN 2010

DEFINITION Newcastle disease virus strain APMV-1/chicken/U.S.(TX)/GB/1948, complete genome.

ACCESSION G0978777

VERSION G0978777.1 GI:21295683904

KEYWORDS

SOURCE Newcastle disease virus

ORGANISM Newcastle disease virus

Virus; ssRNA negative-strand viruses; Nonnegavirales; Paramyxoviridae; Paramyxovirinae; Avulavirinae.

REFERENCE 1 (bases 1 to 15186)
 AUTHORS Paloucci,A., Huma,S., Kayak,S. and Samal,S.K
 TITLE Complete genome sequence of highly virulent neurotropic Newcastle disease virus strain Texas 28
 JOURNAL Virus Genes 41 (Pt. 4): 67-72 (2010)

REFERENCE 2 (bases 1 to 15186)
 AUTHORS Paloucci,A., Huma,S., Kayak,S. and Samal,S.K
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (05-MAR-2010) Department of Veterinary Medicine, University of Maryland, 8075 Greenmead Drive, College Park, MD 20742, USA

FEATURES

source
 1..15186
 /organism="Newcastle disease virus"
 /mol_type="viral cDNA"
 /strain="APMV-1/chicken/U.S.(TX)/GB/1948"
 /isolate="marker"
 /db_xref="taxon:11213"
 /country="USA; Texas"
 /collection_date="1948"
 56..150
 /gene="N"
 122..53
 /gene="P"
 /coding_start=
 /product="nucleocapsid protein"
 /protein_id="ALU02323.1"

Figura 5. Secuencia genética del NDV en la base de datos GenBank

Extracción de RNA viral a partir de cosechas virales

Para el proceso de extracción y purificación se siguió el protocolo con Trizol (Invitrogen), en condiciones estériles y siguiendo las recomendaciones del proveedor.

Se procesaron dos muestras de cosechas virales de *Newcastle* en microtubos estériles de 1.5 mL, se llevó a cabo la etapa de clarificación, con el fin de eliminar por centrifugación los restos celulares de la suspensión y separar la fase acuosa de la inorgánica; esto se hizo centrifugando a 4°C durante 20 min a 12000g, enseguida se descartó el sobrenadante. Posteriormente, se añadió 1 mL de Trizol, en el que se resuspendió el pellet, se dejó reposar durante 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 200 µl de cloroformo y se agitó durante 30 s en el vórtex, dejándose en reposo por 3 min a temperatura ambiente.

Se realizó otra separación de fases mediante una centrifugación de 15 min a 12000g, de la cual se recuperó la fase acuosa que fue llevada a un nuevo tubo de 1.5 mL, al que se le adicionaron 500 µl de isopropanol a 4°C, y se mezcló por inversión. Se dejó la muestra en reposo durante 10 min. Después el RNA precipitado fue sedimentado por centrifugación durante 10

min a 12000g, en seguida se descartó el sobrenadante obteniendo un pellet al cual se le realizó un lavado con etanol al 75%, para posteriormente centrifugarse a 7500g durante 5 min, se dejó secar y finalmente se resuspendió en H₂O estéril tratada con DEPC para su conservación.

Evaluación cualitativa y cuantitativa de los ácidos nucleicos.

Evaluación por espectrofotometría

Se evaluó la concentración del RNA en un espectrofotómetro, mediante las lecturas de absorbancia de la muestra a 260 y 280 nm, determinando su pureza mediante la relación de las dos longitudes de onda. Se usaron 5 µL de la muestra en 795 µL de agua tratada con DEPC, resultando un factor de dilución (FD) de 160.

Para calcular la concentración del RNA se multiplicó el FD por la constante de RNA (40µg/mL) y la lectura de absorbancia a 260 nm. .

$$\text{RNA} = 160 \times 40 (\mu\text{g/mL}) \times A_{260} \text{ nm}$$

Evaluación cualitativa por Electroforesis en gel de agarosa

Para la visualización del RNA extraído, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 2% en TAE 1X (Tris-acetato y EDTA) al que se le adicionaron 3 µL de BrEt (10 mg/mL) lo cual permitió visualizar el RNA obtenido.

Las muestras fueron aplicadas en el gel con una solución de carga con azul de bromofenol. La electroforesis se realizó a un voltaje de 100 V durante 25 minutos aproximadamente. Posteriormente se visualizó el gel en un transiluminador de luz ultravioleta.

Síntesis de cDNA

A partir del RNA obtenido en la extracción se procedió a realizar la síntesis de una cadena de DNA complementario. Se utilizó el kit comercial *First Strand cDNA* (GE Health Care). Se incluyeron tanto un control negativo como uno positivo.

Se calentaron las muestras a 65°C durante 10 min en un termo-baño e inmediatamente después se colocaron en hielo durante 15 min. Enseguida se preparó para cada reacción un volumen de 13 µL de la mezcla de reacción con los componentes del kit más 20 µL del RNA. Se incubaron las muestras durante una hora a 37°C directamente en el termociclador.

Se determinó la concentración y la pureza del cDNA mediante electroforesis y espectrofotometría de manera similar al apartado anterior. Para obtener la concentración del cDNA se usó la siguiente fórmula:

$$\text{cDNA} = 160 \times 37 (\mu\text{g/mL}) \times A_{260} \text{ nm}$$

PCR en gradiente de temperaturas

Con el fin de probar la especificidad de los oligonucleótidos diseñados y encontrar la temperatura óptima para la amplificación del segmento de interés, a partir del cDNA obtenido se realizó la PCR convencional con la *taq* polimerasa de Vivantis.

Para cada muestra se preparó una mezcla de reacción con un volumen final de 25 μL , donde se emplearon 2.5 μL de solución amortiguadora 10x, 2 μL de MgCl_2 (100mM), 0.5 μL de dNTPs (5 μM), 2.5 μL de cada cebador "sentido" y "antisentido" (1 μM), 0.3 μL de *Taq* polimerasa (5 u/ μL) 12.7 μL de H_2O MQ esteril y 2 μL de cDNA.

Se procesaron seis muestras del cDNA del NDV para la PCR con las siguientes condiciones de amplificación:

1. Desnaturalización previa mediante calentamiento inicial durante 10 min a 95°C (temperatura por encima de su temperatura de fusión).
2. 35 ciclos sucesivos de desnaturalización a 94°C durante 30 s, hibridación de los cebadores en un gradiente de temperatura de 53°C a 63°C durante 1 min y extensión a 72°C durante 1 min.
3. Etapa final de extensión a 72°C durante 7 min.
4. Enfriamiento a 4°C para la conservación del DNA.

Se realizó también la evaluación del tamaño de los fragmentos amplificados por medio de electroforesis a 70 V.

qPCR

La técnica de qPCR se llevó a cabo en el termociclador miniopticon de Bio-Rad, se utilizó el kit comercial de Bio-Rad *SsoFast EvaGreen*, que incluye la polimerasa (*Sso7d*), los dNTPs, el MgCl_2 , el agente intercalante *EvaGreen* para una visualización directa de los productos amplificados y los amortiguadores para la reacción.

Se utilizó una placa de 48 pocillos, con 8 filas y 6 columnas. Se distribuyeron a lo largo de las columnas cinco diluciones diferentes de la muestra del virus y el control negativo con agua. Se programó la qPCR en un gradiente de 8 temperaturas diferentes entre 57 y 64°C. Se realizó una primera dilución stock de 1:10 con 2 μL de cDNA y 18 μL de H_2O MQ, de la cual se partió para realizar las diluciones seriadas, con el fin de determinar el umbral de detección de la técnica. Se prepararon 5 diluciones seriadas a partir de 10 μL del stock en microtubos con 90 μL de H_2O MQ (diluyendo 1:10 cada vez).

Se preparó la reacción de qPCR con 10 μL de *SsoFast EvaGreen*, 1.25 μL de cada oligonucleótido y 7.5 μL del cDNA de cada dilución correspondiente. El programa de amplificación de la qPCR se indica en la tabla 4.

Tabla 4
Programa de PCR en tiempo real

Temperatura	Duración (segundos)	Ciclos
95°C	30	X1
95°C	5	x40
64° - 57°C	30	x40
72 °C	30	X40

El termociclador fue programado para que al final de la qPCR se realizara la curva de fusión mediante el aumento de la temperatura en 0.5°C cada 5 s, elevándose desde 65 hasta 95°C y registrando el momento en el que ocurre el máximo cambio del nivel de fluorescencia, que corresponde a la temperatura de fusión de los productos amplificados (figura 6).

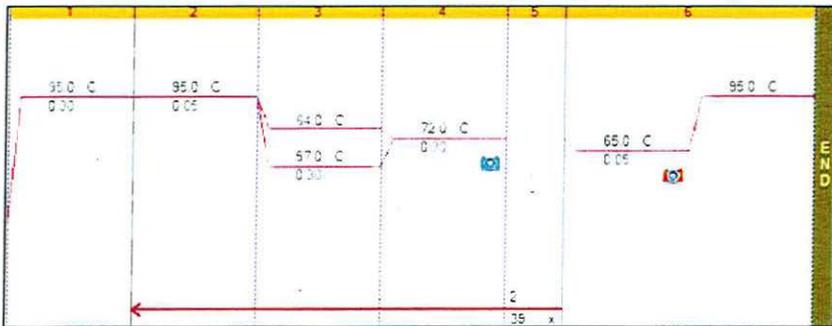


Figura 6. Programación de la PCR en tiempo real. Se incluye la programación para la curva de fusión (*melt curve*).

Análisis de las gráficas y el fragmento amplificado

Posteriormente se llevó a cabo el análisis del material amplificado mediante las curvas y gráficas proporcionadas por el programa CFX Manager de Bio-Rad; además se realizó una electroforesis en un gel de agarosa, para corroborar el tamaño de los fragmentos amplificados.



Resultados

Diseño de los oligonucleótidos

Se diseñó el par de cebadores que amplifican un fragmento de 281 pb correspondiente a un segmento del gen F que codifica para la proteína de fusión del virus, este fragmento se encuentra a partir del nucleótido 4805 (*National center for biotechnology information*); la secuencia de los cebadores se muestra en la tabla 5.

Tabla 5
Secuencia de los cebadores para la amplificación del NDV

Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'	Sitio de reconocimiento
Sentido	TTGACCACTTTGCTCACCCC	Gen F, codifica para la proteína viral de fusión
Antisentido	TTCCCAACTGCCACTGCTAGT	

Extracción y purificación de RNA viral

De la extracción realizada a partir de las cosechas virales de la cepa viral "La Sota" se obtuvo el material para la síntesis del cDNA.

Las lecturas del espectrofotómetro en A260 nm fueron de 0.002 para la muestra 1 y 0.001 para la muestra 2. La concentración del material viral se indica en la tabla 6.

Tabla 6
Concentración de RNA

	A260	Pureza A260/280 nm	Concentración
Muestra 1	0.002	1.718	12.8 µg/mL
Muestra 2	0.001	2.57	6.4 µg/mL

Síntesis de cDNA

Los resultados de la evaluación del cDNA por espectrofotometría, indicaron una adecuada concentración tanto del material de inicio, RNA, como del cDNA, además de presentar una relación de A260/A280 dentro de los límites óptimos para una muestra pura.

Las lecturas obtenidas así como las concentraciones se muestran en la tabla 7.

Tabla 7
Concentración del cDNA

NDV	A260	Pureza A260/A280	Concentración
Muestra 1	0.644	1.776	3812 µg/mL
Muestra 2	0.547	1.769	3238 µg/mL
Muestra 3	0.568	1.770	3362 µg/mL
Muestra 4	0.530	1.7590	3137 µg/mL

PCR convencional

El tiempo total de amplificación por PCR fue de 3 h con 25 min, posteriormente se realizó la electroforesis, mediante la cual se pudo observar los fragmentos amplificados correspondientes a una sola banda de 281 pb que pertenecen al fragmento del NDV (figura 7).

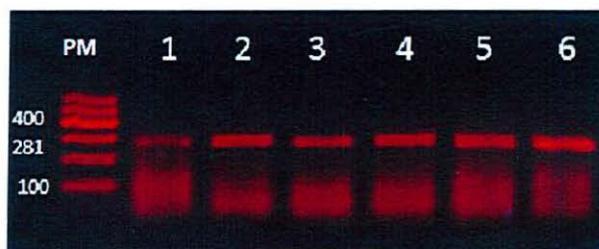


Figura 7. Fragmento de 281 pb del NDV obtenido por PCR convencional. Gradiente de temperaturas de amplificación (en °C) (1) 53, (2) 55.1, (3) 57.1, (4) 59, (5) 60.9 y (6) 63.

qPCR

Se realizó la amplificación del NDV por qPCR con un menor tiempo de reacción, debido a la velocidad de polimerización que presenta la polimerasa del kit para PCR en tiempo real.

En la figura 8 se muestran las cinco diluciones que fueron amplificadas en las distintas temperaturas de hibridación.

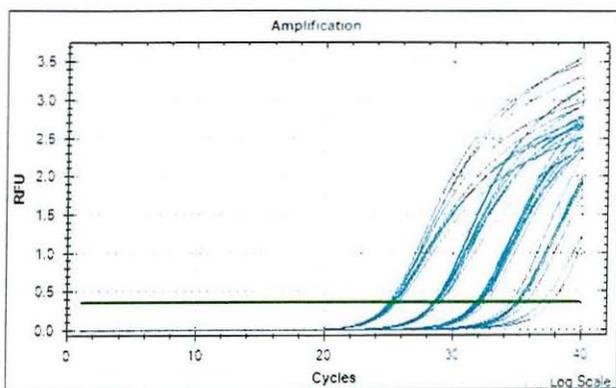


Figura 8. Amplificación por PCR en tiempo real.

Los resultados de la qPCR por gradiente de temperaturas muestran una diferencia en cada una de las diluciones, amplificaron primero aquellas muestras donde la concentración era mayor que aquellas más diluidas. La primera en amplificar fue la dilución 1, con el cDNA diluido 100 veces con respecto a la solución inicial (figura 9). Además, presentó curvas de amplificación en las 8 temperaturas diferentes de hibridación (figura 10).

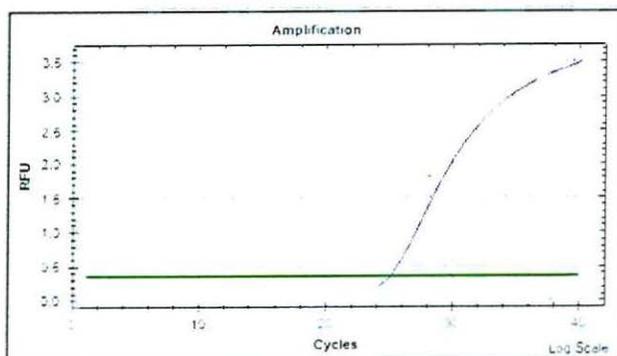


Figura 9. Amplificación de la dilución más concentrada. La curva resaltada es la dilución 1:100 en la temperatura óptima de amplificación.

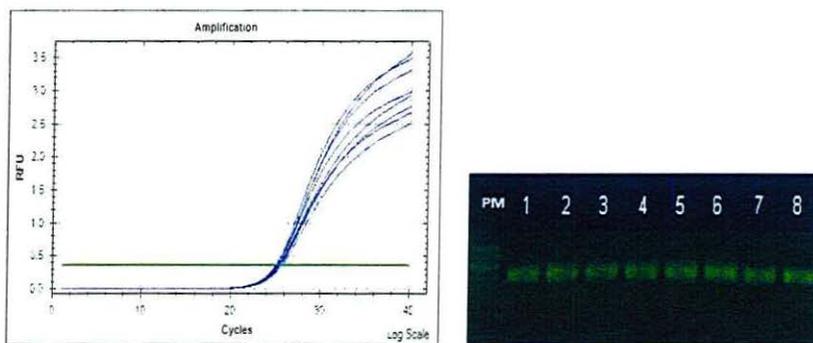


Figura 10. Gradiente de temperaturas de amplificación de la dilución 1:100 en la qPCR y electroforesis de los productos amplificados. Temperaturas en °C (1) 64, (2) 63.6, (3) 62.9, (4) 61.5, (5) 59.8, (6) 58.4, (7) 57.5 y (8) 57.

Las condiciones para una amplificación óptima del virus de la enfermedad de Newcastle se obtienen con una temperatura de hibridación a 62.9°C. A esta temperatura las cinco diluciones amplificaron (figura 11).

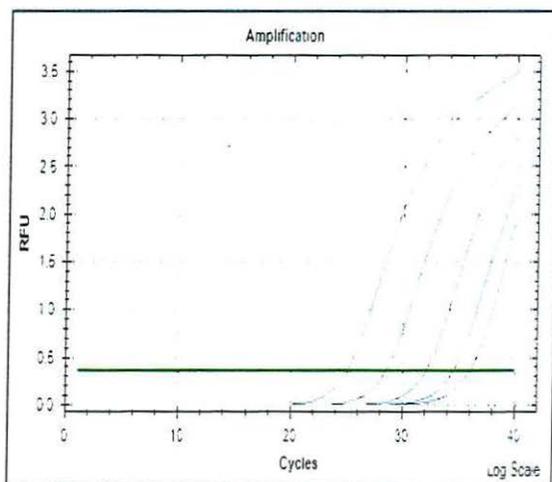


Figura 11. Amplificación del NDV a 62.9°C.

Las gráficas obtenidas indican que es importante realizar la qPCR a una temperatura ideal de hibridación para que los oligonucleótidos y la polimerasa actúen correctamente optimizando el proceso, ya que con una temperatura diferente a la óptima se presenta amplificación únicamente en muestras muy concentradas (figura 12).

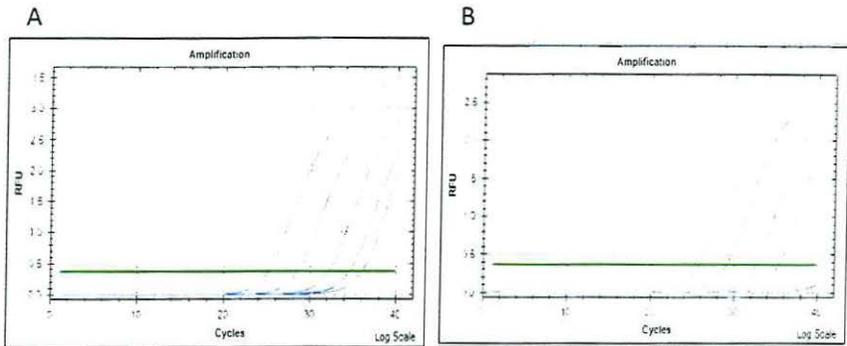


Figura 12. Comparación de dos temperaturas de hibridación. A) Se muestran las 5 diluciones amplificadas a 62.9°C, B) Amplificación de las 5 diluciones a 59.8°, en esta temperatura solo amplifica hasta la dil 1:10⁴.

Análisis de las curvas y el fragmento amplificado

Se corroboró mediante electroforesis el tamaño del fragmento amplificado, se visualizó solo una banda de 281 pb que corresponde al NDV, también se pudo observar la diferencia entre las cinco diferentes diluciones (figura 13).

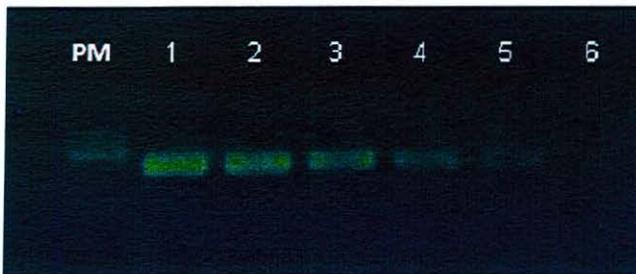


Figura 13. Electroforesis del fragmento del NDV. Amplificación a 62.9°C, primer carril: marcador de peso molecular, (1) dil 1:10¹, (2) dil 1:10², (3) dil 1:10³, (4) dil 1:10⁴, (5) dil 1:10⁵ y (6) control negativo.

A su vez, se analizó el producto de la amplificación mediante las gráficas de la qPCR como el pico de disociación (*melt peak*), el cual mostró un único pico con la temperatura de disociación de 86°C, lo que demuestra que se amplificó un solo fragmento en todas las muestras, evidenciando la ausencia de productos inespecíficos, lo que confirma la especificidad de los oligonucleótidos diseñados (figura 14).

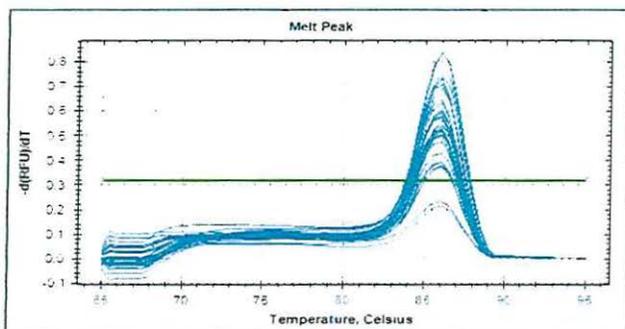


Figura 14. Pico de disociación (*melt peak*). Temperatura de fusión de 86°C del fragmento de 281 pb

En la figura 15 se resalta la muestra más diluida (1:10⁵), sin embargo es el mismo pico de amplificación que en las demás muestras.

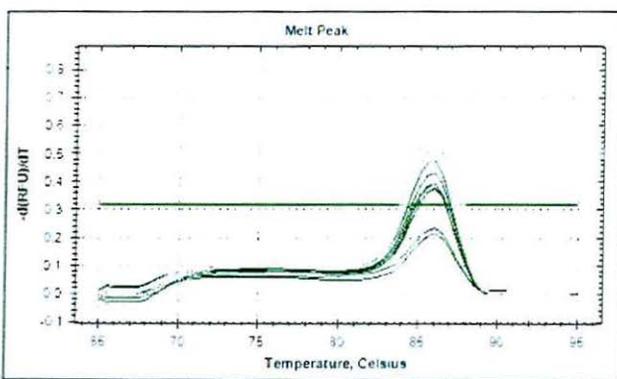


Figura 15. Pico de disociación (*melt peak*) dil 1:10⁵. Resaltado en verde

La disminución de fluorescencia se registra en la curva de fusión, la cual se muestra de manera uniforme, marcando claramente el punto donde la fluorescencia decae a los 86°C (Figura 16).

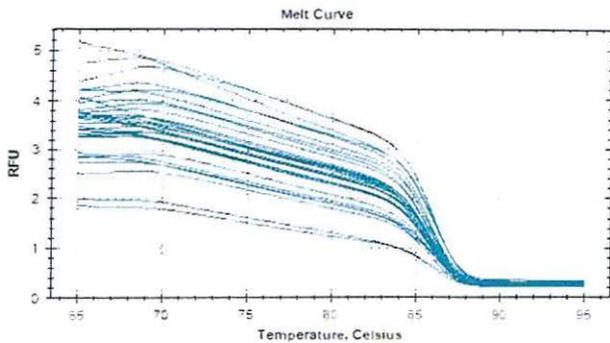


Figura 16. Curva de fusión (*melt curve*) del fragmento de NDV. La fluorescencia disminuye drásticamente a los 86°C.

La relación entre los valores del ciclo umbral y las concentraciones del NDV se presentan en la gráfica de regresión lineal (figura 17).

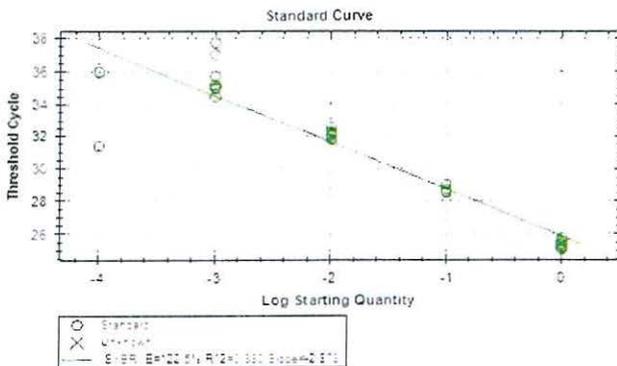


Figura 17. Regresión lineal entre el valor de CT y las diluciones del NDV.

El conjunto de gráficas demuestra la uniformidad en todas las replicas de la muestra en sus distintas concentraciones y temperaturas; lo que indica la reproducibilidad en el experimento (figuras 20 y 21).

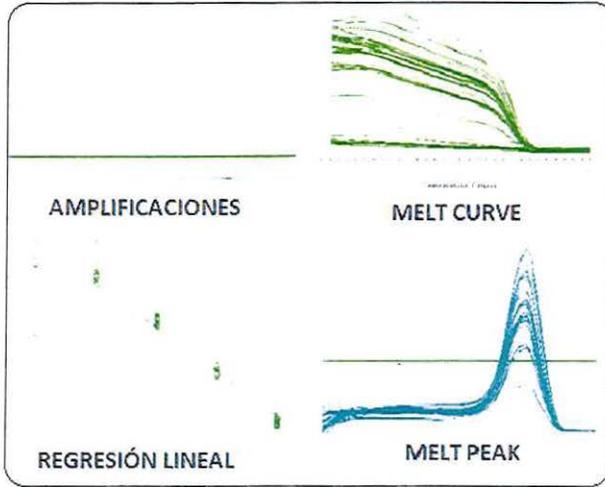


Figura 20. Conjunto de gráficas de la qPCR del NDV.

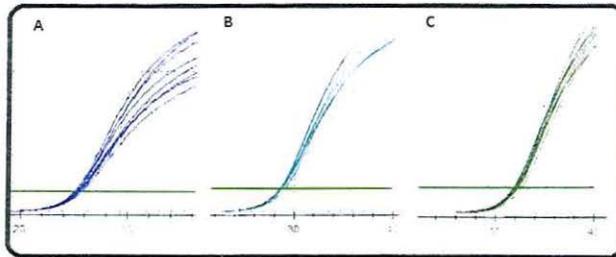


Figura 21. Amplificación del NDV en diferentes concentraciones. A. Dilución 1:10¹, B. dilución 1:10², C. dilución 1:10³

Discusión

Se desarrolló la técnica de qPCR para identificar al virus de la enfermedad de *Newcastle*. Se logró una rápida detección y cuantificación viral que permitirá mejorar el control de calidad en el proceso de elaboración de la vacuna correspondiente. Como se muestra en los resultados, se establecieron para cada una de las etapas, las condiciones necesarias que optimizan la amplificación del fragmento deseado, lo que indica que cada metodología previa a la amplificación se realizó con éxito.

Actualmente se llevan a cabo procedimientos de rutina en cultivos celulares o en embriones de determinada edad con una duración de 7 a 14 días en cada etapa del control de calidad, mismos que por lo menos se realizan en dos ocasiones durante la elaboración de la vacuna (Belak y Thoren, 2003). Se demostró que la qPCR es una alternativa factible y eficiente a los procedimientos de rutina. Con esta metodología el tiempo se reduce a 1 o 2 días, incluyendo todas las etapas desde la extracción del material viral. Además, al compararse el tiempo de amplificación entre las técnicas moleculares de PCR convencional y tiempo real, la qPCR agiliza aun más el proceso de detección y cuantificación del virus.

La implementación de la qPCR para la elaboración de vacunas contra la enfermedad del *Newcastle* no solo contribuirá al mejoramiento de la calidad mediante la optimización del tiempo empleado para su elaboración, sino que también reemplazará algunas otras técnicas, con lo que disminuirán los recursos utilizados en cada procedimiento, como la electroforesis en gel de agarosa, las tinciones con sustancias riesgosas como el bromuro de etidio, el espectrofotómetro y la exposición a la luz ultravioleta para la detección de los fragmentos amplificados (Pham et al., 2005).

La detección del producto amplificado por PCR convencional requiere de la electroforesis para corroborar el tamaño del fragmento, sin embargo a pesar de ser una técnica sencilla y relativamente rápida tiene una especificidad limitada, ya que las moléculas de peso similar no se pueden distinguir en el gel de agarosa, lo que la hace poco adecuada para procedimientos que requieren de técnicas altamente específicas, como es la elaboración de una vacuna (Saunders, 2004). Por el contrario la PCR en tiempo real monitorea los cambios de fluorescencia durante cada uno de los ciclos, y realiza la detección del fragmento de manera simultánea, además es posible hacerlo en la misma placa, sin necesidad de sacar las muestras del equipo, lo que evita una posible contaminación y la degradación de las muestras (Kubista et al., 2006).

La especificidad de la qPCR, es un aspecto crítico para realizar una correcta amplificación, se evalúa mediante el análisis de los datos esquematizados en las gráficas, la curva de fusión y el pico de disociación detectan productos inespecíficos, como los dímeros formados entre

los oligonucleótidos, mediante el registro de la temperatura de disociación de los fragmentos, la cual está directamente relacionada con su secuencia nucleotídica; se observa un pico si los fragmentos tienen un mismo tamaño y una misma temperatura de fusión (Tan et al., 2004). Resulta sencillo mediante estas gráficas identificar contaminaciones que se puedan presentar, ya que los productos inespecíficos se disocian a temperaturas más bajas que los fragmentos específicos (Bustin, 2005).

Para probar la reproducibilidad de la metodología, se prepararon las diluciones seriadas, se realizaron 8 replicas o repeticiones a diferentes temperaturas por cada dilución. Mediante las diluciones también se corroboró el umbral de detección de la técnica, además de haber generado la suficiente intensidad de fluorescencia para ser detectada, pues una excesiva concentración del intercalante en una muestra altamente concentrada puede inhibir la reacción y una insuficiente cantidad no permite la detección del fragmento (Tan et al., 2004).

La región amplificada del NDV corresponde a 281 pb del gen "F" que codifica para la proteína de fusión del virus. La amplificación nos muestra que el umbral de detección se presentó hasta la dilución 10^5 en la temperatura óptima, sin embargo en otras temperaturas ya no se amplificó. Se toma entonces como límite de detección la concentración de $6.8 \times 10^6 \mu\text{g}$ de cDNA para una óptima amplificación.

Para el marcaje del DNA amplificado se utilizó el intercalante EvaGreen, el cual emite una señal fluorescente al unirse al surco menor de la cadena (Costa, 2004) lo que hace más fácil la qPCR, ya que se ha establecido como una herramienta para la detección del NDV y es más sencilla y económica que las sondas marcadas específicamente (Tan et al., 2004).

Una vez concluido este trabajo, la empresa deberá realizar la transferencia de la metodología al área de producción industrial, que consiste en aplicar la qPCR a una muestra con la dosis infectiva mínima y otra muestra con la dosis infectiva máxima permitida en la vacuna, para registrar los valores de CT y establecer un rango de tolerancia; así a la hora de aplicarla a lotes de vacuna bastará con comparar las curvas y valores de CT verificando que se encuentren dentro de ese intervalo.

Finalmente, al haber implementado cada una de las condiciones de qPCR para el virus de la enfermedad de Newcastle, la metodología aquí desarrollada se puede emplear en el diagnóstico clínico de la enfermedad, modificando únicamente el procedimiento para la extracción del material viral, realizando el resto de la amplificación con las mismas condiciones y los mismos oligonucleótidos.

Cabe mencionar una nota de interés en la NOM-052-ZOO-1995 que se encuentra en el punto 5.1.5 donde se establece que "la Secretaría - SAGARPA - podrá autorizar otros procedimientos de elaboración de vacunas conforme los avances tecnológicos". Esto resulta de gran interés ya que, como se describió antes, las metodologías empleadas y establecidas por SAGARPA actualmente, contemplan pruebas de elaboración de las vacunas que estiman incluso semanas para su realización. Resultaría de gran interés que las metodologías moleculares, como la qPCR, fueran empleadas de manera rutinaria para optimizar esfuerzos y recursos.

Conclusiones

El presente trabajo aporta información sobre la estandarización de metodologías moleculares para la detección y amplificación del Paramixovirus aviar-1, causante de la enfermedad de Newcastle, por medio de PCR convencional y qPCR.

Se diseñaron oligonucleótidos específicos que permitieron la amplificación del fragmento de interés y se establecieron los parámetros y condiciones para su amplificación. Esta información permitirá realizar un mejor control de calidad en la elaboración de la vacuna veterinaria contra la enfermedad de Newcastle.

Con base en los resultados obtenidos se concluye que:

- 1) Los oligonucleótidos diseñados amplifican de manera específica el virus de interés, sin amplificaciones inespecíficas o cruzadas.
- 2) La técnica de extracción del RNA viral, bajo las condiciones estandarizadas, permitió obtener material suficiente para su posterior amplificación.
- 3) La amplificación por qPCR del fragmento viral se logró de manera óptima a 62.9°C y se comprobó su especificidad, al mostrar una sola temperatura de disociación de 86°C.
- 4) Es posible utilizar la técnica de qPCR como procedimiento de rutina en el control de calidad de la elaboración de la vacuna.
- 5) Los presentes resultados constituyen una útil herramienta para el análisis y diagnóstico del virus causante de la enfermedad de Newcastle.

National Center for Biotechnology Information:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF309418> (consultado 2010-07-15)

NOM-013-ZOO-1994, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), México.

NOM-052-ZOO-1995, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), México.

Pham HMS., Konnai T., Usui KS., Chang S., Murata M., Mase K., Ohashi and Onuma M. (2005) Rapid detection and differentiation of Newcastle disease virus by real-time PCR with melting-curve analysis. *Arch Virology*. 150:2429-2438.

Roitt, Brostoff and Male (2000) *Inmunología*, 5ta Ed. Harcourt.

Sachse, K and Frey J. (2002) *Methods in Molecular Biology*, vol. 216: PCR Detection of Pathogens: Methods and protocols. Humana Press Inc. Totowa, NJ.

Saunders, NA. (2004) *An introduction to real time PCR in: Real time PCR an Essential Guide*. K.J. Edwards et al., editors. Horizon bioscience.

Tan SW, Omar AR, Aini I, Yusoff K, Tan WS. (2004) Detection of Newcastle Disease Virus using SYBR Green I Real Time Polymerase Chain Reaction. *Acta virol*. 48 : 23-28.

Yusoff K y Tan WS. (2001) Newcastle disease virus: Macromolecules and opportunities, *Avian Pathol*. 30(5):439-455.

Índice de figuras y tablas

Figuras

Figura 1	Esquema de la estructura del virus de la enfermedad de Newcastle	17
Figura 2	Amplificación por PCR convencional	20
Figura 3	Medición del Ciclo umbral	21
Figura 4	Curva de fusión y pico de disociación.	22
Figura 5	Secuencia génica del NDV en la base de datos GenBank	34
Figura 6	Programación de la PCR en tiempo real.	37
Figura 7	Fragmento de 281 pb del NDV obtenido por PCR convencional	40
Figura 8	Amplificación por PCR en tiempo real.	41
Figura 9	Amplificación de la dilución más concentrada	41
Figura 10	Gradiente de temperaturas de amplificación de la dilución 1:100 en la qPCR y electroforesis de los productos amplificados.	42
Figura 11	Amplificación del NDV a 62.9°C.	42
Figura 12	Comparación de dos temperaturas de hibridación	43
Figura 13	Electroforesis del fragmento del NDV	43
Figura 14	Pico de disociación (<i>melt peak</i>).	44
Figura 15	Pico de disociación (<i>melt peak</i>) dil 1:10 ⁵	44
Figura 16	Curva de fusión (<i>melt curve</i>) del fragmento de NDV	45
Figura 17	Regresión lineal entre el valor de CT y las diluciones del NDV.	45
Figura 18	Amplificación del fragmento del NDV a la temperatura y dilución óptimas.	46
Figura 19	Valores del ciclo umbral a 62.9°C	46
Figura 20	Conjunto de gráficas de la qPCR del NDV.	48
Figura 21	Amplificación del NDV en diferentes concentraciones	48

Tablas

Tabla 1	Clasificación de la enfermedad de Newcastle	15
Tabla 2	Clasificación de la cepa viral por mortalidad embrionaria	18
Tabla 3	Comparación entre PCR convencional y PCR tiempo real	21
Tabla 4	Programa de PCR en tiempo real	37
Tabla 5	Secuencia de los cebadores para la amplificación del NDV.	39
Tabla 6	Concentración de RNA	39
Tabla 7	Concentración del cDNA	40
Tabla 8	Cálculo de copias por qPCR	47
Tabla 9	Concentración y cuantificación del NDV por qPCR.	47