

Universidad de Guadalajara

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

División de Ciencias Biológicas y Ambientales



**“Identificación y cuantificación de virus potencialmente
contaminantes de productos biotecnológicos, mediante qPCR
para el virus modelo EMCV”**

Tesis para obtener el título de Licenciado en biología

P R E S E N T A

Sandra Liliana Cervantes Ortiz

Directora: Dra. Ana Laura Márquez Aguirre

Asesor: Dr. Daniel Ortuño Sahagún

Zapopan, Jalisco, 7 de Julio del 2014



Universidad de Guadalajara

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología

**C. SANDRA LILIANA CERVANTES ORTÍZ
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: "**Identificación y cuantificación de virus potencialmente contaminantes de productos biotecnológicos, mediante qPCR para el virus modelo EMCV**", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como directora de dicho trabajo a: **Dra. Ana Laura Márquez Aguirre** y como asesor a: **Dr. Daniel Ortuño Sahagún**

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

ATENTAMENTE

"PIENSA Y TRABAJA"

"Año del Centenario de la Escuela Preparatoria de Jalisco"

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 25 de junio de 2014

DRA. GEORGINA ADRIANA QUIROZ ROCHA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

COMITE DE
TITULACION



DRA. CLAUDIA AURORA URIBE MÚ
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

Dra. Georgina Adriana Quiroz Rocha.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Licenciatura en Biología.
 CUCBA.
 Presente

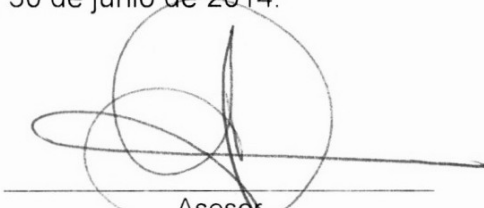
Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad de **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título: **“Identificación y cuantificación de virus potencialmente contaminantes de productos biotecnológicos, mediante qPCR para el virus modelo EMCV”**, que realizó la pasante Sandra Liliana Cervantes Ortiz con número de código 209369724 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

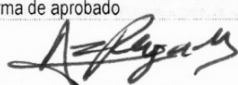
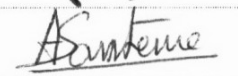
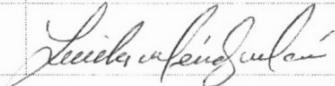
Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 30 de junio de 2014.


 Directora
 Dra. Ana Laura Márquez Aguirre


 Asesor
 Dr. Daniel Ortuño Sahagún

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
DRA. ARGELIA ESPERANZA ROJAS MAYORQUÍN		30/6/2014
DRA. ANNE MARGUERITE HELENE SANTERRE		30/06/2014
M EN C. VERÓNICA PALOMERA ÁVALOS	Verónica Palomera Gb.	30/06/2014
SUPL. DRA. LUCILA MÉNDEZ MORÁN		04/07/2014

COMITE DE TITULACION




 4 Jul - 2014

Esta tesis se realizó en la Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C., CIATEJ-CONACYT, ubicado en la Avenida Normalistas #800, Colinas de la Normal, C.P. 44270, Guadalajara, Jalisco, México, con un fondo de Innovación CONACYT 2012-2013, "Evaluación de un proceso destinado a la eliminación y/o inactivación de virus en productos biofarmacéuticos" (etapa 2), siendo un proyecto otorgado por el Dr. Alejandro Canales Aguirre.

Saber no es suficiente; tenemos que aplicarlo. Tener voluntad no es suficiente, tenemos que implementarla.

(Goethe)

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a mi familia por el apoyo incondicional que me han brindado a lo largo de mi formación, a mis padres quienes han puesto esfuerzo y dedicación en darme todo lo necesario para desarrollarme tanto personalmente como profesionalmente y quienes han sido mis pilares en cada etapa de mi vida. Le agradezco a mi padre haber fomentado en mí un amor por el estudio y el conocimiento y a mi madre su paciencia y ternura, así como sus palabras con las que me ha dado fuerza para seguir siempre adelante. A mis hermanos les agradezco su apoyo incondicional y sus palabras que se han incorporado en mi vida y se reflejan en esas ganas por llegar cada vez más lejos. A Fernando Garcés le agradezco el tener siempre las palabras justas y el haber sido mi mayor apoyo durante la elaboración de esta tesis.

A Eliza Pedraza quien fue una parte fundamental en la realización experimental y escrita de esta tesis, así como una gran compañera de trabajo y amiga, le agradezco el estar ahí siempre con la mejor disposición y el compartir su conocimiento y experiencia durante estos meses; a la Dra. Ana Laura Márquez quien siempre tuvo las mejores observaciones y críticas en cada fase del trabajo, le agradezco profundamente su paciencia y confianza, así como el ser una gran guía y maestra, pero sobre todos le agradezco permitirme adquirir todos los conocimientos que consigo lleva la elaboración de una tesis; Al Dr. Alejandro Canales Aguirre le agradezco el haberme concedido este proyecto de tesis; a CIATEJ y su personal de trabajo les agradezco haberme abierto las puertas de esta gran institución y el haber colaborado con gran disposición en la medida de lo posible al desarrollo de este trabajo; al Dr. Ortuño le agradezco haberme brindado su apoyo y consejos cuando más lo necesite, así como la confianza al recomendarme para este trabajo; A mis sinodales les agradezco sus observaciones tan objetivas en la redacción de este trabajo; A Eduardo Juárez quien fue mi tutor, amigo y guía durante mis estudios en la Licenciatura en Biología, le agradezco el siempre impulsarme a alcanzar mis metas así como haberme apoyado en cada reto que me propuse durante mi preparación en esta hermosa profesión; A mis maestros les agradezco el no haber hecho más que incentivar en mí el amor por la ciencia y el conocimiento en cada una de las aulas que tuve la dicha de compartir con ellos; A mis compañeros y amigos, les agradezco el ser parte de esta aventura, el motivarme y el haber compartido conmigo la alegría y satisfacción de concluir este proyecto. Por último agradezco a la Universidad de Guadalajara el ser mi casa de estudios.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	v
RESUMEN	vi
I. ANTECEDENTES	1
1. Productos biotecnológicos.....	1
1.1 Productos biológicos.....	1
1.2 Productos biotecnológicos.....	1
2. Evaluación de la seguridad viral en productos biotecnológicos y su proceso de producción... 2	
2.1 Seguridad de los productos biotecnológicos.....	2
2.2 Potenciales orígenes de la contaminación viral.....	3
2.3 Evaluación de contaminantes virales.....	4
2.3.1 Selección de los virus para los estudios de detección y remoción/inactivación viral.....	7
3. Virus de la encefalomiocarditis (EMCV).....	8
4. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real “qPCR”.....	9
4.1 Generalidades	9
4.2 PCR en tiempo real (qPCR).....	11
4.3 Cuantificación absoluta.....	14
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
III. JUSTIFICACIÓN.....	17
IV. HIPOTESIS.....	18
V. OBJETIVOS.....	19
5.1 Objetivo General.....	19
5.2 Objetivos Particulares.....	19
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	20
6.1 Desarrollo experimental	20
6.2 Obtención de un plásmido recombinante “pTOPO2.1-2AEMCV”.....	21
6.2.1 Diseño y estandarización de los oligonucleótidos.....	21
6.2.2 Cepa del EMCV.....	25
6.2.3 Extracción del RNA viral del EMCV.....	25
6.2.4 Síntesis de DNA complementario (cDNA) mediante la enzima M-MLV RT.....	26
6.2.5 PCR punto final para el EMCV.....	27

6.2.6 Clonación TOPO 2.1®	28
6.2.7 Purificación del plásmido recombinante.....	29
6.2.8 Análisis del plásmido pTOPO2.1-2AEMC por electroforesis y secuenciación.....	30
6.3 Determinación del rango dinámico de la qPCR para el EMCV.....	31
6.4 Cuantificación absoluta de partículas virales del EMCV por qPCR.	33
VII. RESULTADOS	35
7.1 Obtención de un plásmido recombinante “pTOPO2.1-2A-EMC”	35
7.2 Establecimiento del rango de detección y cuantificación para el EMCV.	39
7.3 Elaboración de la curva estándar para la cuantificación absoluta por qPCR del EMCV.	41
7.4 Cuantificación absoluta del EMCV por qPCR	45
VIII. DISCUSIÓN	48
IX. CONCLUSIONES	50
X. REFERENCIAS	51
XI. GLOSARIO	54
XII. ANEXOS ACADÉMICOS	58
XIII. ANEXOS	59
13.1 Figuras	59
13.2 Tablas	62
13.3 Protocolos	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fabricación de un Biofármaco.....	2
Figura 2. Estructura tridimensional del Virus de la Encefalomiocarditis (EMCV)	9
Figura 3. Esquema del principio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	10
Figura 4. Curva de amplificación de la qPCR.	12
Figura 5. Generación de la señal de fluorescencia del SYBR® Green.....	13
Figura 6. Curva estándar	14
Figura 7. Diagrama del desarrollo experimental.....	20
Figura 8. Secuencia del genoma completo del virus EMCV	21
Figura 9. Diseño de oligonucleótidos para la proteína 2.....	22
Figura 10. Secuencia nucleotídica de la secuencia blanco del EMCV	23
Figura 11. Comparativo de la secuencia blanco del EMCV con otras secuencias similares.....	23
Figura 12. Secuencias con alineamientos significativos con la secuencia blanco 2A-EMCV.....	24
Figura 13. Protocolo de extracción de RNA viral por centrifugado	26
Figura 14. Condiciones de amplificación en gradiente de temperaturas de hibridación.	27
Figura 15. Plásmido vector TOPO® PCR™ 2.1 linealizado	28
Figura 16. Mapa del vector de clonación pCRTM vector TOPO 2.1	29
Figura 17. Purificación de DNA plasmídico por Miniprep	30
Figura 18. Sitios de restricción de la enzima <i>EcoRI</i>	31
Figura 19. Programa de amplificación del Light Carrusel-LightCycler® instrument.....	33
Figura 20. Electroforesis de los productos de PCR en gradiente.	35
Figura 21. Colonias recombinantes de <i>E. coli</i>	36
Figura 22. Electroforesis de los amplicones del DNA plasmídico purificado	37
Figura 23. Electroforesis del plásmido recombinante pTOPO2.1-2A-EMC.....	38
Figura 24. Resultados de la secuenciación del DNA plasmídico	38
Figura 25. Análisis de identidad de la secuencia clonada con la secuencia teórica esperada.....	39
Figura 26. Límite superior de detección y cuantificación para la qPCR del EMCV.....	40
Figura 27. Límite inferior de detección para la qPCR del EMCV	41
Figura 28. Cuantificación por espectrofotometría de la dilución inicial del DNA plasmídico.....	42
Figura 29. Curva estándar para la cuantificación absoluta de partículas del EMCV por qPCR.....	43
Figura 30. Parámetros de la regresión lineal de la curva estándar para el EMCV	44
Figura 31. Análisis de las curvas de fusión	45
Figura 32. Cuantificación absoluta de partículas virales del EMCV por qPCR.....	46
Figura 33. Electroforesis de los productos de la qPCR.....	47
Anexo Figura 1. Organización del genoma del EMCV.	59
Anexo Figura 2. Proteína 2A del virus de la Encefalomiocarditis.....	60
Anexo Figura 3. Generación de la señal de fluorescencia de una sonda TaqMan®	61
Anexo Figura 4. Comparativo de eficiencias de las curvas estándar	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de pruebas para la evaluación de contaminación viral	5
Tabla 2. Definiciones de los parámetros de validación de un ensayo	6
Tabla 3. Ejemplos de virus utilizados en estudios de remoción viral.....	8
Tabla 4. Condiciones de amplificación para la qPCR.....	32
Tabla 5. Cuantificación del RNA total extraído del EMCV.....	35
Tabla 6. Cuantificación del DNA plasmídico purificado.	36
Tabla 7. Conversión de concentración del DNA plasmídico a copias/genomas del EMCV.....	43
Tabla 8. Resultados de la qPCR para la cuantificación absoluta de las partículas virales del EMCV. .	46
Anexo Tabla 1. Ejemplos de productos biológicos.....	62
Anexo Tabla 2. Ejemplos de productos biotecnológicos.....	63
Anexo Tabla 3. Ejemplos de procesos usados para la eliminación viral/inactivación viral.....	64

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

μg	Microgramos
μl	Microlitros
μM	Micromolar
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
ag	attogramos
BCM	Banco de Células Maestro
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i> (Herramienta de alineación básica en búsqueda local)
cDNA	<i>complementary DNA</i> (Ácido desoxirribonucleico complementario)
CFU	<i>colony-forming unit</i> (unidad formadora de colonias)
C _p	<i>Crossing Point</i> (Punto de cruce)
C _t	<i>Threshold cycle</i> (Ciclo umbral)
dNTPs	Desoxirribonucleótidos de trifosfato
EMA	<i>European Agency for Evaluation of Medicinal Products</i> (Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos)
EMCV	<i>Encephalomyocarditis virus</i> (Virus de la Encefalomyocarditis)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
fg	femtogramos
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i> (Conferencia Internacional de la Armonización)
Kb	Kilobases
LB	<i>Luria Bertani</i>
mL	Mililitro
mM	Milimolar
M-MLV RT	<i>Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i> (Ácido Ribonucleico mensajero)
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i> (Centro Nacional para la Información Biotecnológica)
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
nM	Nanomolar
NTC	<i>No Template Control</i> (Control sin plantilla)
OD	<i>Optical density</i> (Densidad óptica o absorbancia)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
pg	Picogramos
pH	Potencial de hidrógeno
QA	<i>Quality Assurance</i> (Control de calidad)
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (PCR cuantitativa)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido Ribonucleico)
RT	<i>Reverse Transcription</i> (Transcripción inversa)
S	Segundo
ssRNA	<i>Single stranded RNA</i> (RNA de cadena sencilla o monocatenario)
T.A.	Temperatura ambiente
T _m	<i>Melting temperature</i> (Temperatura de fusión)

RESUMEN

Los productos biotecnológicos son productos relativamente recientes, que son fabricados mediante técnicas de biología molecular con gran impacto en el tratamiento y prevención de diversas enfermedades que anteriormente no contaban con un buen pronóstico; por lo que se prevé el desarrollo de productos biotecnológicos más complejos para el tratamiento de enfermedades que actualmente son intratables (Talbot y Waller, 2004).

Para producir este tipo de productos, típicamente se utilizan sistemas celulares de expresión ya sea procariontes o eucariontes, siendo estos últimos los mayormente utilizados y específicamente los derivados de líneas celulares animales. Debido a su origen, este tipo de productos presentan una alta propensión a la contaminación por agentes adventicios de los cuales los virus representan una gran preocupación ya que puede repercutir en sectores económicos, sociales y clínicos.

Los productos biotecnológicos en la actualidad se consideran seguros respecto a la contaminación por virus al estar regulados por normas para su producción y distribución, basadas en la aplicación de programas de detección de virus y pruebas de remoción y/o inactivación viral (Aranha, 2012); sin embargo los retos persisten. Entre ellos el control y prevención de contaminantes virales en niveles muy bajos, que representan una carga suficiente para comprometer el proceso entero de manufacturación (Rosenberg *et al.*, 2011).

En la detección y cuantificación de los contaminantes virales, numerosas técnicas y pruebas pueden ser empleadas tanto para la evaluación de virus endógenos como adventicios; Sin embargo, en este trabajo se propuso la aplicación de una qPCR la cual satisface determinadas limitantes mostradas por otros tipos de ensayos (por ej. Los basados en infectividad), permitiendo obtener información oportuna sobre el estado del proceso y los materiales, con la capacidad de ser aplicada para la cuantificación absoluta de virtualmente todos los virus (tanto infecciosos como no infecciosos) por medio de la cuantificación del número de copias o genomas. Así mismo, presenta la capacidad de ser sesgada hacia potenciales contaminantes o a agentes de interés, con una sensibilidad superior a otros ensayos de detección (Rosenberg *et al.*, 2011) en la evaluación de cualquier eliminación física del virus, que no puede ser caracterizada por un ensayo de infectividad (BioReliance, 2014).

La estandarización de la técnica fue realizada para el virus de la encefalomiocarditis “EMCV”, esto debido a sus características fisicoquímicas que le confieren mediana resistencia a los tratamientos de remoción e inactivación viral comúnmente utilizados, permitiéndole ser utilizado como modelo para representar otros virus con características similares.

Por último la estandarización de la técnica fue llevada a cabo utilizando DNA de un plásmido recombinante “pTOPO2.1-2A-EMC” ya que su manipulación es de menor riesgo en comparación con la manipulación del virus directamente y a la vez presenta mayor resistencia a la degradación por congelación y manipulación.

Como resultado se obtuvo que la qPCR es una técnica altamente sensible en la detección de partículas virales totales, que requiere menor tiempo para su ejecución en comparación con estudios basados en infectividad.

I. ANTECEDENTES

1. Productos biotecnológicos.

1.1 Productos biológicos.

La *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos "FEUM"* (2011) define como **producto biológico** a cualquier preparación producida o sintetizada a partir de organismos biológicos o de sus productos (incluyendo las que utilizan biotecnología y otras tecnologías de vanguardia), utilizados como agentes de diagnóstico, preventivos o terapéuticos (Anexo Tabla 1).

Este tipo de productos presentan diferencias fundamentales con otro tipo de medicamentos, resultado de la variabilidad intrínseca debida a su propia naturaleza y proceso de fabricación. En contraste con los productos químicos, son mezclas difíciles de caracterizar o identificar que tienden a ser menos estables que los productos químicos por su sensibilidad a factores ambientales, tales como cambios de temperatura, oxidación, luz y contenido iónico, así mismo se reconocen como productos sensibles o propensos a la contaminación por agentes adventicios (Barakat, 2012).

Debido al desarrollo e investigación, los productos biológicos convencionales se han sumado a los productos fabricados por biotecnología, derivándose en productos biotecnológicos (FEUM, 2011).

1.2 Productos biotecnológicos

Los **productos biotecnológicos** son preparaciones en cuyo proceso de producción intervienen organismos vivos o parte de ellos, modificados genéticamente por biotecnología molecular, los cuales tienen actividad farmacológica, y son identificados por sus propiedades físicas, químicas y biológicas, siendo empleados como reactivos para diagnóstico o principio activo (**biofármacos**) en **medicamentos biotecnológicos** o **biomedicamentos**, que en forma farmacéutica, poseen efecto terapéutico, preventivo o de rehabilitación (FEUM, 2011) (Anexo Tabla 2).

Los biofármacos y los medicamentos biotecnológicos pueden ser:

- Proteínas recombinantes: Proteínas producidas por cualquier ente biológico procarionte o eucarionte, al que se le introduce mediante técnicas de ingeniería genética, una secuencia de ácido desoxirribonucleico exógena (Figura 1).
- Anticuerpos monoclonales: Inmunoglobulinas intactas producidas por hibridomas, inmunoconjugados, fragmentos de inmunoglobulinas y proteínas recombinantes derivadas de inmunoglobulinas.
- Péptidos sintéticos: Péptidos constituidos por menos de cuarenta aminoácidos que son producidos por técnicas de biotecnología molecular.
- Ácidos nucleicos sintéticos o de plásmidos: Ácidos nucleicos obtenidos de plásmidos o modificados por técnicas de ingeniería genética

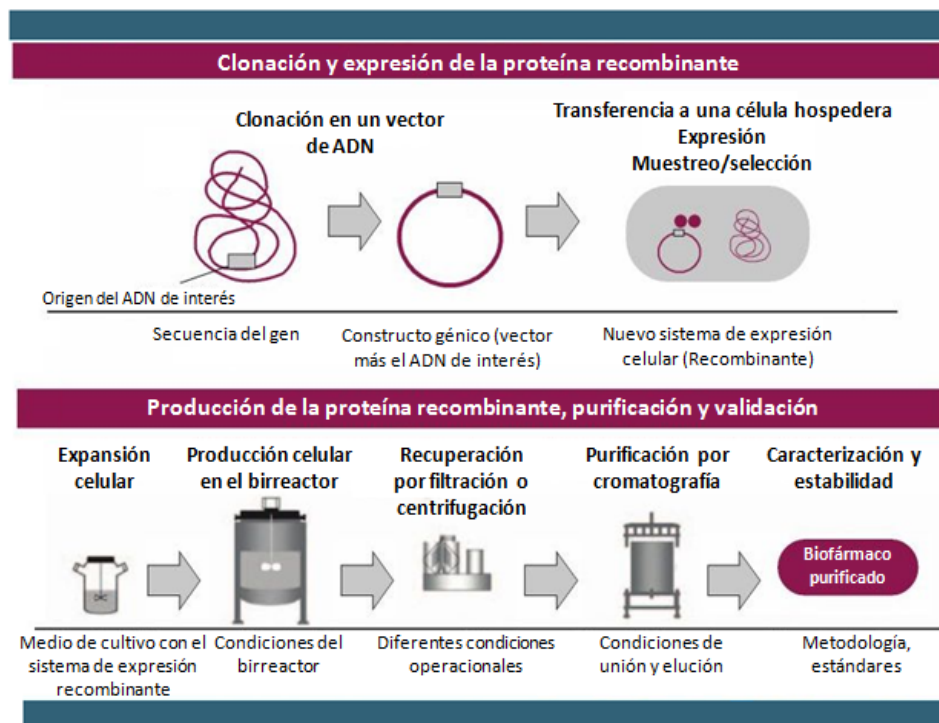


Figura 1. Fabricación de un Biofármaco. El DNA de interés codificante para la proteína precursora debe ser insertado en un vector de expresión estable y adecuado, para formar un constructo génico que a su vez es introducido en una célula hospedera, que constituye un nuevo sistema de expresión celular (recombinante). Las células recombinantes son posteriormente seleccionadas con el fin de aislar un clon a partir del cual se construye el Banco de Células Maestro (BCM) y el Banco de Células de Trabajo (BCT), constituidos por células uniformes y bien caracterizadas, que mantenidas en un biorreactor en condiciones estrechamente controladas, producirán el producto deseado. En el proceso pueden entrar impurezas, ya sea por las células utilizadas en el sistema de expresión celular (por endotoxinas, virus, secuencias de DNA, agregados, subproductos no deseados, etc.), el medio de cultivo (especialmente en productos aislados a partir de sobrenadante del cultivo celular) o por componentes relacionados con el proceso; por lo que después de recuperar las células y liberar la proteína de interés, esta debe ser aislada, purificada y procesada enzimáticamente para obtener la molécula madura, libre de subproductos no deseados. Por último, tras numerosas etapas de purificación el Biofármaco se liofiliza y se formula por adición de complejos y amortiguadores fisiológicos que mantengan su integridad (Krämer y Sauer, 2010).

2. Evaluación de la seguridad viral en productos biotecnológicos y su proceso de producción.

2.1 Seguridad de los productos biotecnológicos.

Debido a la naturaleza y características de los productos biotecnológicos, estos presentan riesgos inherentes que ponen en peligro su seguridad y por lo tanto su calidad e integridad. A la fecha se ha reportado que los procesos de manufactura, así como el producto final son propensos a la contaminación por agentes adventicios introducidos de manera no intencional, tales como bacterias, hongos y virus (Suvarna *et al.*, 2011). De estos, la contaminación viral en los productos biotecnológicos representa un riesgo potencialmente devastador, que repercute en sectores económicos, sociales y clínicos (Offit, 2006), por desgracia es más común de lo que generalmente se reporta o se ha apreciado anteriormente (Rosenberg *et al.*, 2011).

En el pasado ocurrieron muchos casos de contaminación viral por agentes adventicios, cuya presencia se desconocía y no se sospechaba, esto principalmente en productos biológicos derivados de diferentes materiales, lo que dió la pauta a proporcionar una medida de confianza de que cualquier virus desconocido, insospechado y perjudicial, puede ser removido del proceso de producción (FDA, 1998).

En la actualidad los productos biotecnológicos se encuentran altamente regulados mediante normas para su producción y distribución, mediante la aplicación de programas de detección de virus y pruebas de remoción y/o inactivación viral (Aranha, 2012), las cuales apegadas a las “Buenas prácticas de fabricación” proporcionan un nivel de confianza de que posibles contaminantes virales puedan ser eliminados, garantizando la seguridad y calidad del producto antes de que este pueda administrarse; sin embargo los retos persisten (FDA, 1998; FEUM, 2011).

Uno de los mayores retos respecto al control y prevención de contaminantes virales es su detección, incluso en niveles muy bajos, que representan una carga suficiente para comprometer el proceso entero de manufacturación (Rosenberg *et al.*, 2011).

En México, la norma oficial mexicana NOM-EM-001-SSA1-2012 establece los lineamientos para las “Buenas prácticas de fabricación” de Medicamentos biotecnológicos y sus biofármacos (Secretaría de Salud, 2012), mientras que a nivel mundial son establecidos por la *International Conference on Harmonisation* (ICH) en sus diversas guías, de las cuales la guía Q5A en particular establece los requerimientos para la evaluación de la seguridad viral de los productos biotecnológicos derivados de líneas celulares de origen humano o animal.

2.2 Potenciales orígenes de la contaminación viral.

El riesgo de contaminación viral es una característica común en todos los productos biotecnológicos derivados de líneas celulares, lo cual podría tener graves consecuencias clínicas. Esta contaminación es causada por virus definidos como agentes infecciosos, submicroscópicos, e intracelularmente replicantes, por lo que son parásitos celulares obligados, incapaces de crecer y experimentar fisión binaria, constituidos por un genoma viral de ácido Ribonucleico (RNA) o desoxirribonucleico (DNA), que codifica proteínas necesarias para llevar a cabo su ciclo infeccioso, multiplicación y dispersión a otras células hospederas vivas susceptibles y permisibles (Flint *et al.*, 2009; Herrero Uribe, 2011). Los contaminantes virales pueden ser introducidos de manera no intencional en las líneas celulares de partida o de manera accidental como agentes adventicios durante el proceso de producción (FDA, 1998; ICH, 1999):

- Virus presentes en el Banco de Células Maestro (BCM): Las células pueden presentar infecciones virales latentes/persistentes o retrovirus endógenos que pueden transmitirse verticalmente de una generación a la siguiente. Tales células pueden expresar al virus infeccioso constitutivamente o expresarlo inesperadamente. Los virus pueden ser introducidos al BCM por rutas como: 1) derivados de líneas celulares de animales infectados; 2) uso de virus para establecer la línea celular; 3) uso de reactivos biológicos contaminados; 4) contaminación durante la manipulación celular.
- Virus adventicios introducidos durante el proceso de producción: Estos pueden filtrarse al producto final por varias rutas que incluyen: 1) el uso de reactivos biológicos

contaminados; 2) el uso de virus para la inducción de la expresión específica de genes que codifican a la proteína deseada; 3) el uso de reactivos o equipos en común para la fabricación de múltiples productos dentro de las mismas instalaciones; 4) el uso de excipientes contaminados durante la formulación; 5) contaminación durante su manipulación.

Monitorear estos parámetros puede ser útil para la detección temprana de contaminación por virus adventicios.

2.3 Evaluación de contaminantes virales

Según la ICH en su guía *“Q5A Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived From Cell Lines of Human or Animal Origin”*, se espera que la seguridad de los productos biotecnológicos sea garantizada por la aplicación de programas de evaluación de virus y la caracterización de la robustez del proceso de eliminar contaminantes virales por remoción y/o inactivación viral; entendiéndose como remoción viral a la separación física de las partículas virales y como inactivación a la reducción de la infectividad del virus (ICH, 1999).

El propósito de estos estudios y evaluaciones, es demostrar la eliminación de contaminantes virales conocidos que pueden estar presentes en el BCM y proporcionar un nivel de confianza de que cualquier virus adventicio que pueda tener acceso al proceso de producción sin ser detectado sea eliminado, por lo que han surgido tres enfoques principales y complementarios para controlar la potencial contaminación viral de los productos (EMA, 2008):

- Evaluar las líneas celulares y materiales sin procesar, para comprobar la ausencia de virus indeseables.
- Evaluar la ausencia de virus infecciosos durante pasos claves del proceso de producción.
- Evaluar la robustez de los procesos de producción de remover y/o inactivar virus infecciosos fortuitamente.

La evaluación de la robustez del proceso es necesaria para validar que un proceso de producción es eficaz en la eliminación de una gran cantidad de contaminantes virales, ya que permite evaluar y caracterizar la(s) etapa(s) del proceso que pueda(n) ser eficaces en la remoción/inactivación de posibles virus adventicios de manera general, mediante el establecimiento de la reducción global de dichos virus tanto cualitativamente como cuantitativamente, a partir del conocimiento de cuántos virus están presentes en el material sin procesar y cuántos de esos virus pueden ser eliminados durante el proceso de manufacturación (EMA, 2008). Estos estudios son llevados a cabo en un laboratorio independiente equipado con lo necesario para el trabajo virológico, utilizando un modelo a escala reducida que represente lo más cercanamente posible las etapas del proceso de producción (ICH, 1999).

2.3.1 Pruebas para la detección y cuantificación de contaminantes virales.

En la detección y cuantificación de los contaminantes virales, numerosas técnicas y pruebas pueden ser empleadas tanto para la evaluación de virus endógenos como adventicios, la Tabla 1 describe algunos ejemplos de ensayos, con algunas de sus ventajas y limitaciones.

Para su validación, es esencial que se incluyan controles apropiados, que garanticen el rendimiento, sensibilidad y especificidad (Tabla 2) adaptadas según el propósito y enfoque del estudio (FDA, 1998; ICH, 1999).

Tabla 1. Ejemplos de pruebas para la evaluación de contaminación viral. Tomada de la guía QA5 de la FDA (1998).

Pruebas	Artículo de prueba	Capacidad de detección	Limitación de detección
Producción de anticuerpos	Lisado de células y su medio de cultivo	Antígenos virales específicos	Antígenos no infecciosos para sistemas de prueba en animales
Muestreo de virus <i>in vivo</i>	Lisado de las células y su medio de cultivo	Amplia gama de virus patógenos de humanos	Agentes que no se puedan reproducir o producir enfermedades en el sistema de prueba.
Muestreo de virus <i>in vitro</i> para: 1. Caracterización del banco celular 2. Muestreo de producción	1. Lisado de células y su medio de cultivo (para cocultivo viral, las células deben estar intactas) 2. Volumen de la cosecha sin procesar o lisado de las células y su medio de cultivo procedentes del reactor de producción	Amplia gama de virus patógenos de humanos	Agentes que no se puedan reproducir o producir enfermedades en el sistema de prueba.
Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) en: 1. Sustrato celular 2. Sobrenadante de cultivo celular	1. Células viables 2. Sobrenadante del cultivo libre de células	Virus y partículas como virus (VLPs)	Prueba cualitativa con evaluación de identidad
Transcriptasa Inversa (RT)	Sobrenadante del cultivo libre de células	Retrovirus y RT en retrovirus	Solo detecta enzimas con actividad óptima bajo condiciones preferenciales. La interpretación puede ser difícil debido a la presencia de enzimas celulares; puede haber interferencia en algunas muestras concentradas.
Infectividad de los Retrovirus (RV)	Sobrenadante del cultivo libre de células	Retrovirus infecciosos	Los RV no se pueden replicar o formar focos o placas discretas en el sistema de prueba elegido
Cocultivo 1. Infectividad punto final 2. MET punto final 3. RT punto final	Células viables	Retrovirus infecciosos	Los RV no puede replicar 1. Véase arriba infectividad por RV 2. Véase arriba MET ¹ 3. Véase arriba RT
PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa)	Células, líquido de cultivo y otros materiales	Secuencias específicas de virus	Requiere la presencia de oligonucleótidos. No indica si el virus es infeccioso.

MET= Microscopía Electrónica de Transmisión; RT= Transcriptasa Inversa; RV= Retrovirus; PCR=Reacción en Cadena de la Polimerasa; VLPs= partículas como virus (del inglés Virus-like Particles). ¹ En adición, es difícil distinguir artículos de prueba a partir de células indicadoras.

Tabla 2. Definiciones de los parámetros de validación de un ensayo. No todos los parámetros son aplicables a todos los tipos de ensayos, por lo que cada prueba debe considerarse con base en los parámetros que se investigan durante la validación (Baylis y Blümel, 2010).

Parámetros	Definición
Especificidad	Capacidad del ensayo para evaluar un analito de interés en una mezcla que puede tener la presencia de sustancias que interfieren
Exactitud	Grado de concordancia entre el valor medido y el valor real
Precisión	Grado de concordancia entre una serie de mediciones <ul style="list-style-type: none"> • Precisión intra-ensayo (es decir, capacidad de repetición en el mismo ensayo) • Precisión inter-ensayo (es decir, la capacidad de repetición entre ensayos)
Linealidad	Capacidad de una prueba para generar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en el ensayo
Rango	Intervalo de concentración en el que un ensayo es preciso, exacto, lineal
Límite de cuantificación	Cantidad más baja (y más alta) de un analito en una muestra que se puede determinar cuantitativamente con precisión y exactitud
Límite de detección	Cantidad mínima de un analito en una muestra que puede ser detectado, aunque no necesariamente cuantificado
Fidelidad	Capacidad de un ensayo de no ser afectado por los pequeños pero deliberados cambios en las condiciones del ensayo

De las pruebas existentes, los ensayos basados en infectividad, que requieren la observación de citopatogenicidad en cultivos celulares o en sistemas de expresión, son el método preferido (Suvarna *et al.*, 2011). Este tipo de estrategias presentan determinadas limitaciones que pueden contribuir al avance de la contaminación viral. Entre las limitantes se encuentra el hecho de que las pruebas de detección *in vitro* no son específicas, toman semanas para llevarse a cabo y se emplean generalmente para evaluar los materiales de partida; además de que requieren un panel de líneas celulares indicadoras, que no soportan el crecimiento de todos los potenciales agentes virales o no muestran un efecto citopático al exponerse a un virus infeccioso. Así mismo, existe una posibilidad de que los componentes del medio usados en la matriz del cultivo celular interfieran en la habilidad de detectar a los virus, especialmente cuando contienen suero fetal bovino (SFB). Por último, este tipo de estudios solo permiten la detección de virus infecciosos, lo cual no es siempre útil, ya que existen procesos donde se debe asegurar y evaluar la ausencia de virus tanto infecciosos como no infecciosos, donde la inactivación viral no es una opción (Rosenberg *et al.*, 2011).

Dichas limitaciones pueden ser superadas mediante el uso de ensayos alternativos realizados en paralelo, que aporten a su vez información útil en ciertas circunstancias y sirvan como herramienta para comprender el posible alcance de la contaminación viral. Pruebas como la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) pueden proporcionar información oportuna sobre el estado del proceso y los materiales, con la capacidad de ser aplicada para la cuantificación absoluta de virtualmente todos los virus, con la capacidad de ser sesgada hacia aquellos que puedan infectar el sistema de producción biotecnológico o a agentes de interés, con una sensibilidad superior a otros ensayos de detección (Rosenberg *et al.*,

2011); así mismo permite evaluar cualquier eliminación física del virus, que no puede ser caracterizada por un ensayo de infectividad (BioReliance, 2014).

2.3.1 Selección de los virus para los estudios de detección y remoción/inactivación viral.

Para aplicación de las pruebas de detección y cuantificación de virus se requiere la selección de los virus a evaluar, justificados según el propósito del estudio. Estos virus se clasifican en los programas de contaminación viral en tres categorías: virus relevantes, virus modelo específico, y virus modelo no específicos (FDA, 1998; ICH, 1999):

- Virus relevantes: Virus utilizados para evaluar el proceso de producción cuando se ha detectado o se sospecha su presencia en el proceso de manufacturación o en cualquier sustrato, material o reactivo utilizado. Se eligen virus iguales o de la misma especie que los detectados o sospechados y el proceso debe demostrar su capacidad de eliminarlos.
- Virus modelo específicos: Virus estrechamente relacionados (mismo género o familia) con los virus relevantes, que presentan propiedades físicas y químicas similares. Se recomienda su utilización cuando los virus relevantes no están disponibles o no se adaptan al proceso de evaluación.
- Virus modelo no específicos: Virus utilizados cuando el propósito del estudio es evaluar la robustez y capacidad del proceso de manufacturación de remover y/o inactivar virus de manera general. Se eligen virus que presenten una resistencia importante a tratamientos físicos y químicos o que representen una amplia gama de propiedades fisicoquímicas, con particular atención a los virus no envueltos.

La Tabla 3 resume algunos ejemplos de virus modelo que han sido utilizados en los estudios de remoción viral, los cuales varían en tamaño, forma, tipo de genoma, estructura, y resistencia a diversos métodos de inactivación fisicoquímica.

Generalmente los virus grandes envueltos son más fáciles de remover por filtración, pH bajo o detergentes, que en combinación con solventes permiten el rompimiento de su envoltura, mientras que los virus sin envoltura son bastante estables al calor y no son inactivados fácilmente por estos métodos (Farshid *et al.*, 2005). Así mismo, los virus del tamaño de los Picornavirus (20-25 nm) no pueden separarse tan fácilmente de las proteínas de tamaño similar por filtración, ya que en este tamaño las proteínas más grandes son también retenidas (Henzler y Kaiser, 1998).

El virus de la Encefalomiocarditis (EMCV) se propone como virus modelo no específico, debido a que sus características fisicoquímicas le confieren una mediana resistencia a los procesos de remoción e inactivación comúnmente utilizados (Anexo Tabla 3), siendo un buen modelo en la evaluación de la robustez del proceso de remover o inactivar virus fortuitamente.

Tabla 3. Ejemplos de virus utilizados en estudios de remoción viral. Tomada de la guía QA5 de la FDA (1988) y modificada con Millipore (2002).

Virus	Familia	Género	Hospede-ro natural	Genoma	Envuelto	Tamaño (nm)	Forma	Resisten-cia ¹	Categoría
Virus de la estomatitis vesicular	Rhaddo	Vesiculovirus	Equino Bovino	RNA	Si	70x150	Bala	Baja	Virus modelo no específico
Parainfluenza virus	Paramyxo	Paramyxovirus	Varios	RNA	Si	100 a 200+	Pleo-esférico	Baja	Virus modelo no específico
Virus de la leucemia murina (MuLV)	Retro	Oncovirus tipo C.	Ratón	RNA	Si	80-110	Esférico	Baja	Virus modelo específico/retrovirus
Virus Sindbis	Toga	Alphavirus	Humano	RNA	Si	60-70	Esférico	Baja	Virus modelo específico para el VHC
Virus de la diarrea bovina (BVDV)	Flavi	Pestivirus	Bovino	RNA	Si	50-70	Pleo-esférico	Baja	Virus modelo específico para el VHC
Virus de la pseudorrabia	Herpes		Cerdo	DNA	Si	120-200	Esférico	Mediana	Virus modelo específico para el herpesvirus
Poliovirus Sabin tipo 1	Picornia	Enterovirus	Humano	RNA	No	25-30	Icosaédrica	Mediana	Virus no específico
Virus de la encefalomiocarditis (EMCV)	Picornia	Cardiovirus	Ratón	RNA	No	25-30	Icosaédrica	Mediana	Virus endógeno/no específico
Reovirus 3	Roe	Orthoreovirus	Varios	RNA	No	60-80	Esférico	Mediana	Virus modelo no específico
SV40 o virus vacuolizante	Papova	Polyomavirus	Mono	DNA	No	40-50	Icosaédrica	Muy alta	Virus modelo no específico
Parvovirus (canino y porcino)	Parvo	Parvovirus	Canino, Porcino	DNA	No	18-24	Icosaédrica	Muy alta	Virus modelo para el B19/no específico

MuLV= Virus de la leucemia murina (del inglés *murine leukemia virus*); BVDV=Virus de la diarrea viral bovina (del inglés *Bovine Viral Diarrhea Virus*); VHC= Virus de la hepatitis C; EMCV= Virus de la Encefalomiocarditis; SV40= Virus vacuolizante (del inglés *Simian vacuolating virus 40*).¹ La resistencia es relativa al tratamiento específico y se utiliza en el contexto de la comprensión de la biología del virus y de la naturaleza del proceso de fabricación. Los resultados reales pueden variar en función de los tratamientos. Estos virus no se consideran de uso obligatorio.

3. Virus de la encefalomiocarditis (EMCV).

El virus de la encefalomiocarditis (EMCV) pertenece a la familia Picornaviridae la cual es una de las familias más grandes y diversas de virus de RNA y virus particularmente resistentes a la inactivación fisicoquímica; dentro de esta familia se incluye el género *Cardiovirus* al cual pertenece el EMCV (Yeo *et al.*, 2013). El EMCV se caracteriza por ser un virus pequeño, esférico, no envuelto con una cápside icosaédrica de 30 nm de diámetro (Figura 2).

Su genoma viral consta de una cadena sencilla de RNA sentido positivo (+ssRNA) de aproximadamente 7.8 Kb, que sirve como molde para su replicación y el cual es infeccioso por sí mismo, lo que significa que no requiere de proteínas virales para iniciar la expresión de genes. Su genoma permite la traducción directa a una poliproteína (L-1ABCD-2ABC-3ABCD) que posteriormente mediante su escisión da lugar a 13 proteínas virales maduras (Carocci y Bakkali-Kassimi, 2012).

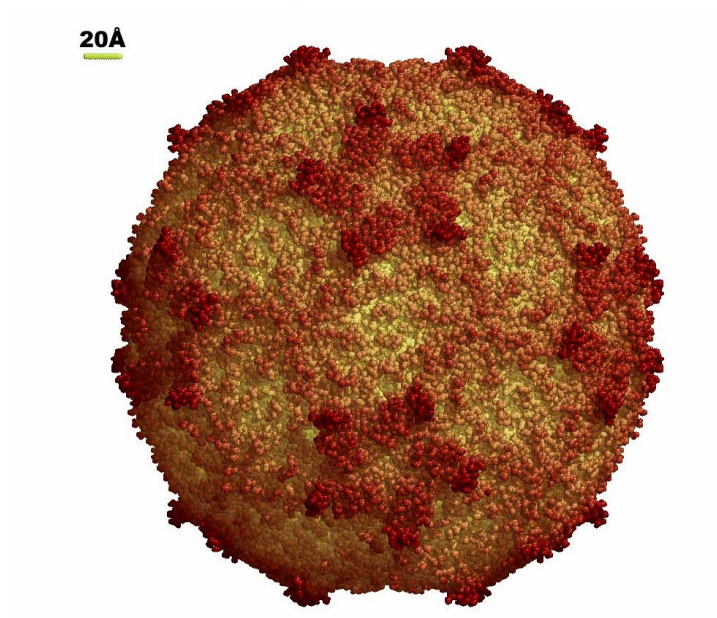


Figura 2. Estructura tridimensional del Virus de la Encefalomiocarditis (EMCV). Imagen tomada de <http://www.virology.wisc.edu/virusworld/ICTV8/mgo-mengo-ictv8r.jpg>.

El EMCV se caracteriza por ser un virus lítico (provoca lisis de la célula hospedera) muy resistente, que puede ser infeccioso durante días incluso en un entorno hostil, siendo bastante estable en un amplio espectro de pH, así mismo al carecer de envoltura presenta resistencia a la acción de solventes/detergentes como cloroformo, éter, etc. (Carocci y Bakkali-Kassimi, 2012). Así mismo, por su tamaño (30 nm) es un virus difícil de remover por filtración en preparaciones de proteínas con alto peso molecular que compartan un tamaño similar (Yokoyama *et al.*, 2004).

El EMCV es un virus mundialmente distribuido con potencial de infectar gran cantidad de especies hospederas de vertebrados y cruzar la barrera entre especies (Canelli *et al.*, 2010; Carocci y Bakkali-Kassimi, 2012). Este virus presentan potencial zoonótico para infectar humanos, sin embargo la enfermedad es relativamente infrecuente y poco comprendida por su corta duración y baja titulación (Liu *et al.*, 2013; Oberste *et al.*, 2009).

4. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real “qPCR”

4.1 Generalidades

La PCR en tiempo real (qPCR) fue desarrollada en 1996 basada en los principios de la PCR convencional, con una amplia gama de aplicaciones para la detección y cuantificación de ácidos nucleicos con alta especificidad y sensibilidad (Garibyan y Avashia, 2013; Tevfik, 2006).

La PCR es una técnica que permite amplificar exponencialmente a fragmentos específicos de DNA en cantidades mínimas, con gran sensibilidad durante ciclos repetidos de amplificación; esta técnica requiere del DNA molde, a la cual se le hibridan un par de oligonucleótidos complementarios a la secuencia inicial y terminal del amplicón, con la función de determinar el sitio de unión de la enzima DNA polimerasa. Esta enzima es la encargada de sintetizar una hebra complementaria a la secuencia molde agregando desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs). Así mismo, es necesaria la presencia de una sustancia amortiguadora que permita un ambiente químico propicio para la DNA polimerasa.

La amplificación del fragmento de interés consiste en ciclos repetidos con tres pasos principales (Figura 3), llevados a cabo mediante un termociclador que calienta y enfría los tubos de reacción a la temperatura requerida (Rahman *et al.*, 2013):

- **Desnaturalización:** La doble cadena de DNA debe ser calentada de 94-96 °C con el fin de separar las hebras mediante la ruptura de los puentes de hidrógeno que unen a las dos hebras del DNA. Previo al primer ciclo, el DNA es frecuentemente desnaturalizado por un tiempo prolongado (1-5 min), para asegurar que ambas cadenas sean separadas completamente.
- **Alineación o Hibridación:** Posterior a la desnaturalización, las hebras de DNA son llevadas a una temperatura más baja y óptima para la alineación/hibridación de los oligonucleótidos, esta temperatura depende de la composición de los mismos y usualmente esta en un rango de entre 50-62 °C.
- **Extensión:** Se utiliza la temperatura óptima para la DNA polimerasa (usualmente 72 °C) para que está sintetice una cadena de DNA complementaria a la secuencia molde.

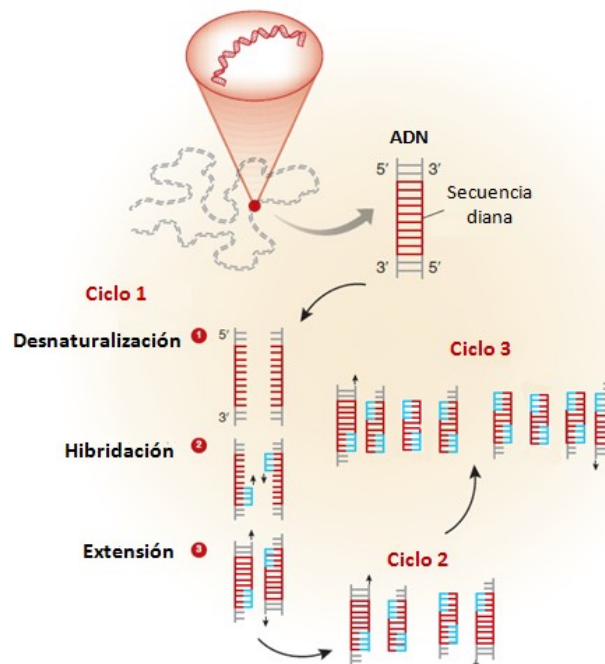


Figura 3. Esquema del principio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Imagen tomada de Garibyan y Avashia (2013).

Por último para el análisis de los productos de PCR el método más comúnmente utilizado es la electroforesis en gel de agarosa, la cual permite la separación de los productos de DNA por cargas eléctricas, de acuerdo a su tamaño, el cual se compara con un marcador de peso molecular que contiene bandas de tamaño conocido (Garibyan y Avashia, 2013).

La PCR se ha consolidado como un procedimiento realmente útil en virología, sin embargo solo existen kits comerciales para una limitada cantidad de patógenos, típicamente de interés comercial. Por otro lado, al ser una técnica de elevada sensibilidad, presenta el riesgo de contaminación cruzada entre muestras, por lo que requiere de controles que aseguren la ausencia de contaminación cruzada y de agentes inhibidores que puedan crear falsos negativos. Otra de las dificultades que presenta estriba en la eficacia de amplificación, que al ser exponencial se ve afectada por pequeñas oscilaciones que se traducen en importantes variaciones en la cantidad de DNA obtenido al final de la reacción, así mismo la eficacia de amplificación va disminuyendo con el tiempo hasta que la reacción llega a una fase de saturación, donde no hay más síntesis de DNA, lo que ocasiona que la cantidad de DNA obtenido no siempre guarde fiel relación con la concentración de DNA inicial en la muestra (Costa, 2004).

Una de las variantes de la PCR convencional, conocida como reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR), solventa algunas de las limitaciones previamente mencionadas. Esta técnica permite resultados más reproducibles en un rango más amplio de detección, con lo cual se detectan y cuantifican partículas virales con elevada sensibilidad (Lovatt, 2002).

4.2 PCR en tiempo real (qPCR)

La qPCR consiste en una continua colección de señales de fluorescencia de la PCR en un intervalo de ciclos, lo que permite de manera simultánea la amplificación y detección del producto sintetizado en cada uno de los viales, mediante la incorporación de un lector de fluorescencia en los instrumentos de qPCR (Costa, 2004). El incremento en la fluorescencia en cada ciclo se refleja gráficamente en las curvas de cinética de la reacción de cada una de las muestras, lo que permite controlar la amplificación en las fases iniciales, cuando la concentración de los reactivos no es limitante y el efecto en la variabilidad de la eficiencia tiene menor importancia. Así mismo, presenta la ventaja de no utilizar ningún tratamiento o acción posterior, lo que reduce considerablemente el riesgo de contaminación y permite aumentar el flujo de muestras por ensayo (Bustin *et al.*, 2005).

La amplificación de cualquier secuencia por qPCR se define en cuatro fases: 1-basal; 2-exponencial; 3-lineal y 4-saturación. La fase basal está por debajo del nivel de detección del instrumento a pesar de que existe una amplificación exponencial. La fase exponencial comprende desde una señal detectable temprana hasta el valor máximo exponencial, su duración depende de la concentración y cantidad de la secuencia molde, en una reacción con un 100% de eficiencia se duplicará el producto en cada ciclo. En la fase lineal la eficiencia de la amplificación comienza a disminuir, por lo que se sintetizan menos del doble del producto hasta que gradualmente alcanza la fase de saturación, en la cual la amplificación cesa (Figura 4).

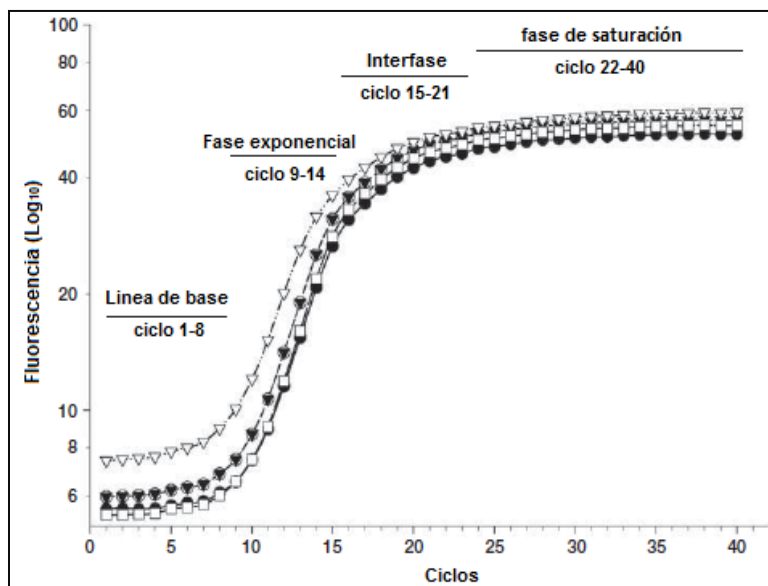


Figura 4. Curva de amplificación de la qPCR. Se observan cuatro fases: basal, seguida de la fase geométrica o exponencial, posteriormente la amplificación se reduce y llega a una fase lineal o interfase y finalmente a la fase de saturación, en la que ya no se produce ningún aumento adicional en la señal (Tomada de Tevfik, 2006).

Para cada muestra el programa calcula el número de ciclo en el cual el lector del equipo comienza a detectar un incremento significativo en la fluorescencia con respecto a la señal de base, conocido como umbral de detección " C_t " (del inglés *Cycle threshold*) o el punto de cruce " C_p " (del inglés *Crossing point*) (Tevfik, 2006).

El principio de cuantificación es sencillo: entre más cantidad de copias de la secuencia molde haya al comienzo del ensayo, se requerirá menor número de ciclos de amplificación para generar un número de amplicones que sean detectables por el equipo, en consecuencia se requieren menos ciclos de amplificación para que la fluorescencia alcance el nivel del umbral de detección C_t/C_p el cual se muestra como un dramático incremento en la señal y el cual es específico para cada marca comercial de instrumentos de qPCR (Bustin *et al.*, 2005).

La señal de fluorescencia puede ser incorporada mediante dos tipos de sistemas: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos (Costa, 2004).

Agentes intercalantes: son el sistema más simple al implicar la incorporación de fluorocromos libres al producto de DNA de doble cadena recién sintetizado. El principio básico subyace en que la señal de fondo de los agentes intercalantes en estado libre es muy baja, al igual que cuando se unen a ácidos nucleicos de cadena sencilla. En contraste, cuando se unen al surco menor del DNA de doble cadena aumenta dramáticamente la producción de fluorescencia, aproximadamente 2,000 veces la señal inicial de las moléculas libres. El colorante más utilizado y popular es el SYBR® Green I (Figura 5) debido a su bajo costo y simplicidad, al requerir únicamente un par de oligonucleótidos y porque su mecanismo de detección le permite ser utilizado en cualquier ensayo, lo que se traduce en una optimización fácil de realizar. Sin embargo, al unirse de manera indistinta al DNA de doble cadena de productos generados inespecíficamente o de dímeros de los oligonucleótidos frecuentes en la PCR, por lo que se recomienda para mejorar su especificidad, emplear condiciones óptimas de reacción y realizar un análisis de temperaturas de fusión.

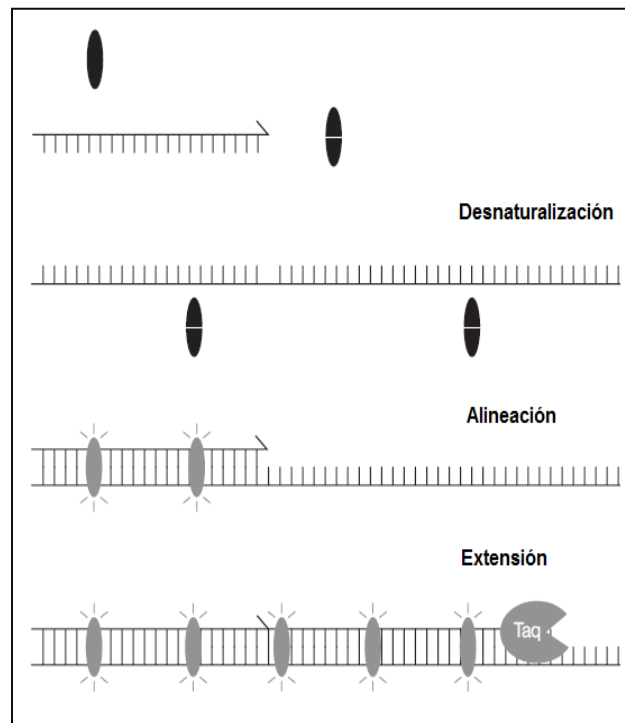


Figura 5. Generación de la señal de fluorescencia del SYBR® Green. Al formarse la estructura de DNA de doble cadena el SYBR® Green I se unirá resultando en un dramático incremento de la señal de fluorescencia, la cual incrementa proporcionalmente con el número de moléculas de DNA de doble cadena sintetizadas. El proceso se repite en cada ciclo con un incremento total de fluorescencia (Tomada de Tefvik, 2006).

Sondas de hibridación específicas: Son sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas (Anexo Figura 3), el mecanismo consiste en oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5', el cual emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor al extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra, las moléculas deben estar especialmente próximas y sus espectros de emisión y absorción deben estar solapados. Durante la amplificación, la sonda se hibrida con su cadena complementaria y la DNA polimerasa al desplazarse con su actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, lo que libera el fluorocromo donador, por consecuencia se separan espacialmente y la fluorescencia emitida por el primero es captada por el sensor del equipo.

Existen dos métodos para la cuantificación de moléculas blanco por qPCR; la cuantificación relativa y la absoluta. La cuantificación relativa es típicamente utilizada para evaluar cambios en la expresión de RNA mensajero (mRNA) o transcriptomas bajo diferentes condiciones, tipos de células, fisiología, patologías, etc., por lo que para realizarlo se utiliza un control endógeno, típicamente un gen constitutivo que normalice la cantidad de moléculas diana en una muestra, mientras que la cuantificación absoluta permite cuantificar la concentración/número de copias de una secuencia específica mediante el uso de una curva estándar.

4.3 Cuantificación absoluta

La qPCR cuantitativa se traduce en la conversión de las señales de fluorescencia de cada reacción en cadena de la polimerasa a un valor numérico, que representa con precisión la cantidad de ácidos nucleicos de una secuencia específica de DNA o RNA (Lovatt, 2002).

La concentración inicial de ácidos nucleicos de las muestras se cuantifica mediante la adición de controles externos con concentraciones conocidas y crecientes, que se traducen en una curva estándar (Figura 6a), la cual permite interpolar los valores de fluorescencia de las muestras desconocidas, determinar la eficiencia y sensibilidad del ensayo, así como los límites de detección teóricos y reales (rango dinámico) con independencia de las variables asociadas a la preparación de la muestra o de la transcripción inversa (Tevfik, 2006).

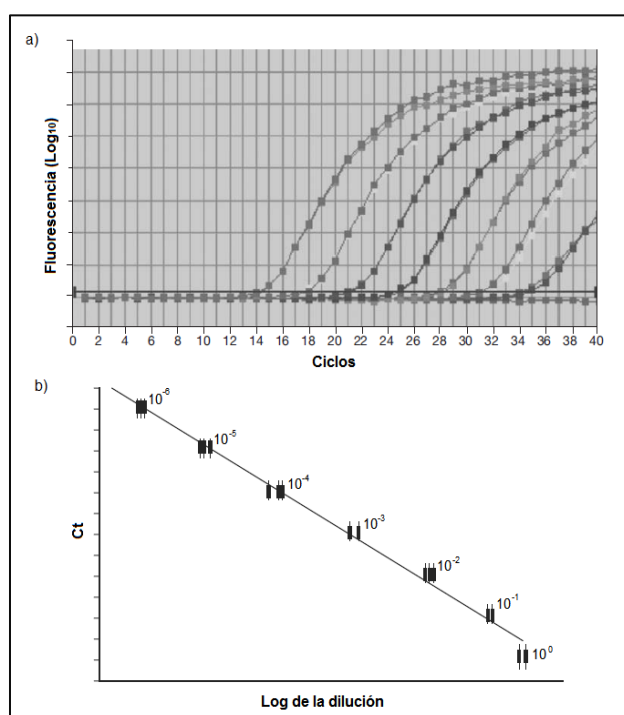


Figura 6. Curva estándar. a) Diluciones seriadas (factor de dilución 10) del DNA molde utilizado como estándar en un experimento de qPCR; b) cálculo de regresión lineal a partir de los C_p/C_t de cada una de las diluciones seriadas utilizando el método de mínimos cuadrados. Imagen tomada de Tevfik (2006).

La curva estándar se elabora a partir de un molde de DNA (por ej. plásmidos con la porción relevante del producto de la PCR, oligonucleótidos sintéticos o cDNA) con una concentración conocida, a partir del cual se preparan diluciones seriadas conocidas con un factor de dilución de 10, los cuales formarán parte de un cálculo de regresión lineal (Figura 6b) basado en el método de mínimos cuadrados:

$$y = mx + b$$

Donde $y=C_{t/p}$, m =pendiente, $x=\log_{10}$ de la cantidad de DNA molde, b = intersección en el eje "y".

Así mismo, se puede conocer la eficiencia de la amplificación con base en el coeficiente de determinación R^2 el cual está basado en la pendiente de la línea obtenida en la regresión lineal, mediante la siguiente fórmula:

$$Eficiencia = \left[10^{(-1/pendiente)}\right] - 1$$

La eficiencia es el principal indicador de cómo procedió la qPCR, y describe la precisión de las diluciones de la curva estándar y del pipeteo (Anexo Figura 4). Un ensayo perfecto tendría una pendiente de -3,32 (una eficiencia del 100%), una intersección entre 33-37 ciclos y un R^2 de 1.00 (Tevfik, 2006).

La aplicación de la cuantificación absoluta de patógenos proporciona información valiosa que ha revolucionado la forma de cuantificar los ácidos nucleicos. Así mismo, aplicada a los estudios de detección de patógenos ha sido de gran beneficio para el descubrimiento y la comercialización de nuevos productos terapéuticos y productos biofarmacéuticos (Lovatt, 2002).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los productos biotecnológicos debido a su origen y proceso de fabricación presentan riesgos inherentes de propensión a contaminación por agentes adventicios, entre ellos virus introducidos de manera no intencional al proceso de manufacturación y al producto mismo.

Pese a las regulaciones apegadas a las “Buenas prácticas de fabricación” de los productos biotecnológicos los retos persisten, entre ellos la evaluación de contaminantes virales en cantidades muy bajas o no detectables, que representan una carga suficiente para comprometer la seguridad del proceso entero de manufacturación y el producto final.

Así mismo, las pruebas más utilizadas para evaluar la seguridad de los productos respecto a la contaminación viral son las basadas en infectividad, las cuales muestran ciertas limitaciones como su inespecificidad, larga duración para llevarse a cabo, restringidas a la evaluación de las líneas celulares y materiales de partida, además de que requieren el uso de líneas celulares indicadoras que no soportan el ciclo infeccioso de todos los virus y/o no muestran un efecto citopático. Por último, estas pruebas están restringidas a la evaluación de etapas de inactivación viral, sin poder evaluar la remoción de los contaminantes durante el proceso.

III. JUSTIFICACIÓN

Para garantizar que los productos biotecnológicos están libres de contaminantes virales se realizan estudios de seguridad viral adaptados al proceso de producción en los cuales se evalúa la robustez del mismo para inactivar y/o remover virus adventicios mediante el uso de virus modelo no específicos.

Por lo anterior, en el presente trabajo se propone la estandarización de una prueba de qPCR para la detección y cuantificación absoluta de partículas virales/genomas en procesos de remoción viral (por ej. Métodos cromatográficos y nanofiltración), permitiendo la cuantificación tanto de partículas infecciosas como no infecciosas y secuencias de DNA viral con alta especificidad y sensibilidad reduciendo el riesgo de omitir la detección/cuantificación de partículas virales que se encuentran en concentraciones muy pequeñas que muchas veces no son evaluables mediante otras técnicas, de manera que sus resultados puedan ser contrastados con pruebas de infectividad. Así mismo, se propone realizar la estandarización de la técnica para el EMCV el cual es utilizado como *virus modelo no específico* en los estudios de remoción viral, representando a otros contaminantes virales con características fisicoquímicas similares.

IV. HIPOTESIS

La cuantificación absoluta por medio de la técnica de qPCR, permitirá identificar y cuantificar partículas virales (infecciosas y no infecciosas) por medio del número de genomas del EMCV presentes en muestras de un producto biotecnológico inoculadas con un título viral conocido de este virus.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General.

Estandarizar la técnica de qPCR para la identificación y cuantificación absoluta de partículas virales del EMCV en muestras de un producto biotecnológico inoculadas con un título viral conocido del mismo

5.2 Objetivos Particulares.

1. Obtener el plásmido recombinante pTOPO2.1-2AEMC para la expresión de la secuencia 2AEMC a partir de la cual se elaborara la curva estándar para la cuantificación absoluta del EMCV por qPCR.
2. Determinar el rango dinámico de cuantificación del EMCV por qPCR.
3. Cuantificar el número de genomas del virus EMCV por qPCR en muestras de un producto biotecnológico de prueba inoculadas con un título viral conocido.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Desarrollo experimental

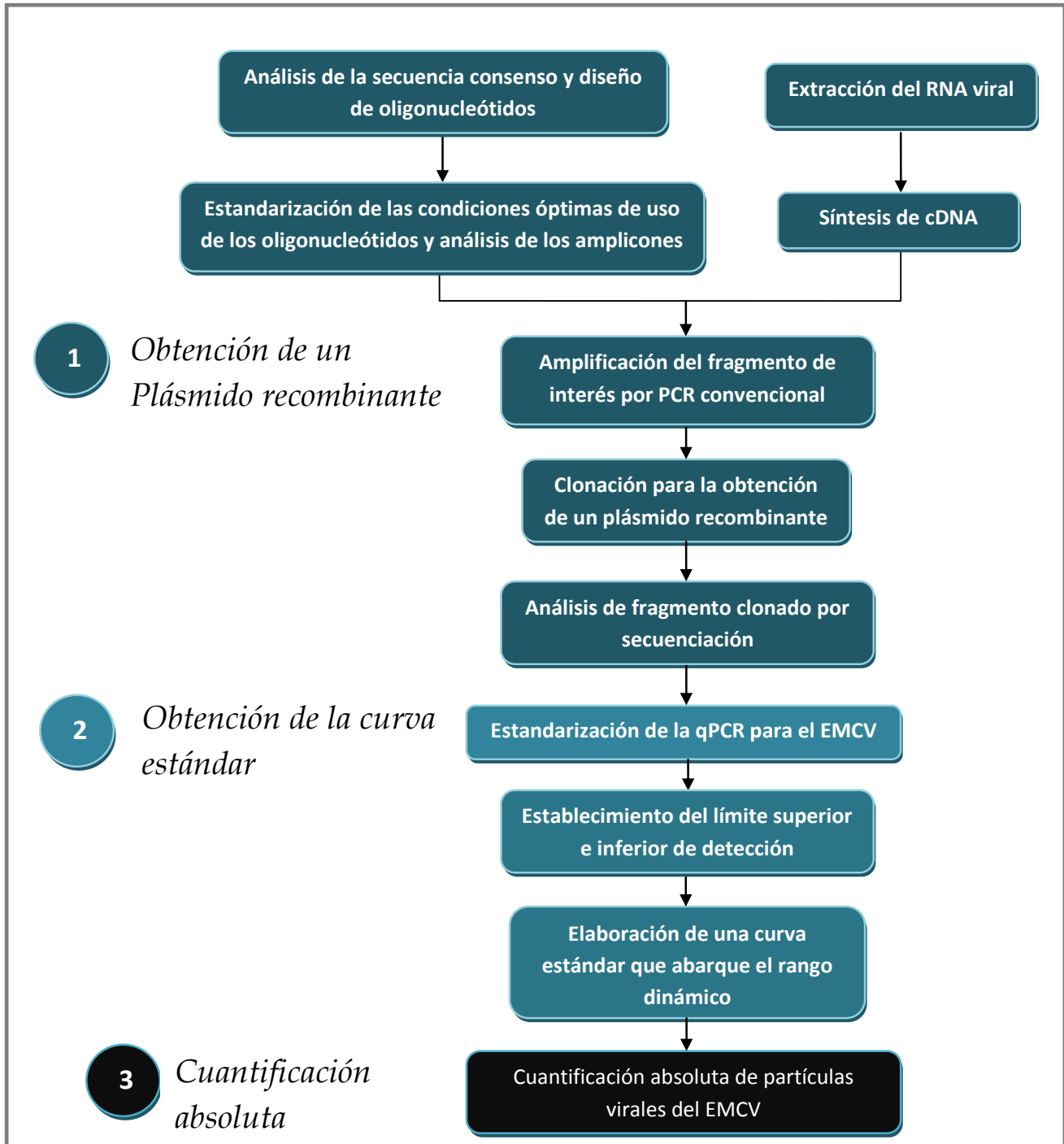


Figura 7. Diagrama del desarrollo experimental

El desarrollo experimental fue desarrollado en el laboratorio bioseguridad 2 del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), A.C.

6.2 Obtención de un plásmido recombinante “pTOPO2.1-2AEMCV”.

6.2.1 Diseño y estandarización de los oligonucleótidos.

Se consultó la base de datos del *GenBank* perteneciente al *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), con el fin de obtener la secuencia consenso del EMCV y con base en esta realizar el diseño de oligonucleótidos (Figura 8).

The screenshot shows the NCBI GenBank entry for Encephalomyocarditis virus, complete genome (NC_001479.1). The main content area displays the following information:

- LOCUS:** NC_001479 7835 bp ss-RNA linear VRL 01-JUN-2012
- DEFINITION:** Encephalomyocarditis virus, complete genome.
- ACCESSION:** NC_001479
- VERSION:** NC_001479.1 GI:9626692
- DBLINK:** BioProject: [PRJNA15307](#)
- KEYWORDS:** RefSeq.
- SOURCE:** Encephalomyocarditis virus
- ORGANISM:** [Encephalomyocarditis virus](#)
Viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage; Picornavirales; Picornaviridae; Cardiovirus.
- REFERENCE 1 (bases 1 to 7835):**
AUTHORS: Duke, G.M., Hoffman, M.A. and Palmenberg, A.C.
TITLE: Sequence and structural elements that contribute to efficient encephalomyocarditis virus RNA translation
JOURNAL: J. Virol. 66 (3), 1602-1609 (1992)
PUBMED: [1310768](#)
- REFERENCE 2 (bases 1 to 7835):**
CONSTRIM: NCBI Genome Project
TITLE: Direct Submission
JOURNAL: Submitted (01-AUG-2000) National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA

The right sidebar contains the following sections:

- Analyze this sequence:** Run BLAST, Pick Primers, Highlight Sequence Features, Find in this Sequence
- LinkOut to external resources:** VirOligo Compilation Lab [VirOligo Compilation Lab], ViPR - Virus Pathogen Resource [Virus Pathogen Resource]
- Related information:** BioProject, Full text in PMC, Gene

Figura 8. Secuencia del genoma completo del virus EMCV
(Obtenido de la base de datos de *GenBank* del NCBI).

La búsqueda previamente realizada dió como resultado la secuencia consenso del genoma del EMCV con el número de referencia: NC_001479.1, que consta de un RNA monocatenario positivo (+ssRNA) con una longitud de 7835 pb, de la cual se seleccionó el gen “*EMCVgp1*” en la región codificante a la proteína 2A (3537-3965 pb), conservada en el EMCV (Anexo Figura 2).

Para el diseño de oligonucleótidos se utilizó la herramienta en línea *Primer-Blast* del NCBI, tomando en cuenta los criterios generales de PCR descritos en diversos protocolos, los cuales son desglosados a continuación (Dieffenbach *et al.*, 1993; Elsalam, 2003; Nolan *et al.*, 2006):

- Tamaño de los oligonucleótidos entre 18-24 bases de longitud, para reducir al mínimo los problemas de hibridación.
- Contenido de G/C de alrededor del 50%, con el fin de incrementar la eficiencia de unión.
- Temperatura de disociación del oligonucleótido-DNA (T_m) de entre 56 a 62°C, para asegurar la especificidad de estos con respecto al DNA molde, asegurando que ambos oligonucleótidos presenten la misma T_m .
- El extremo terminal 3' es esencial para el control de alineamientos inespecíficos, por lo que debe

tener un total alineamiento o mostrar desajustes mínimos respecto a la secuencia blanco. Así mismo, se debe evitar la complementariedad de bases entre nucleótidos en el extremo 3', que puedan favorecer la formación de estructuras secundarias entre ellos mismos que compitan o supriman la formación del producto deseado, por lo que se recomienda no usar más de 2 o 3 G/C en las cinco bases del extremo 3'.

- Se recomienda para la estabilidad del alineamiento tener mayor contenido de G/C en el extremo 5' a comparación del extremo 3'.
- Se debe evitar tener tramos largos de una sola base (es decir, más de tres o cuatro, especialmente G o C) que pueden causar un efecto de deslizamiento y la formación de estructuras secundarias.
- Se debe considerar tener amplicones cortos (120-250 pb) ya que pueden ser clonados, analizados y ser cuantificados de forma más fiable.

Con base en esta secuencia y los criterios previamente mencionados se diseñaron los oligonucleótidos para el EMCV, así mismo se verificó su alineamiento con el gen "EMCVgp1" en la región codificante a la proteína 2A (Figura 9).

Sentido: Región (3753-3773) secuencia: 5' aagaatacctaccaggcggtt 3' tamaño: 21 pb

Anti-sentido: Región (3917-3937) secuencia: 5' agtaggtccgcaaagtaacca 3' tamaño: 21 pb

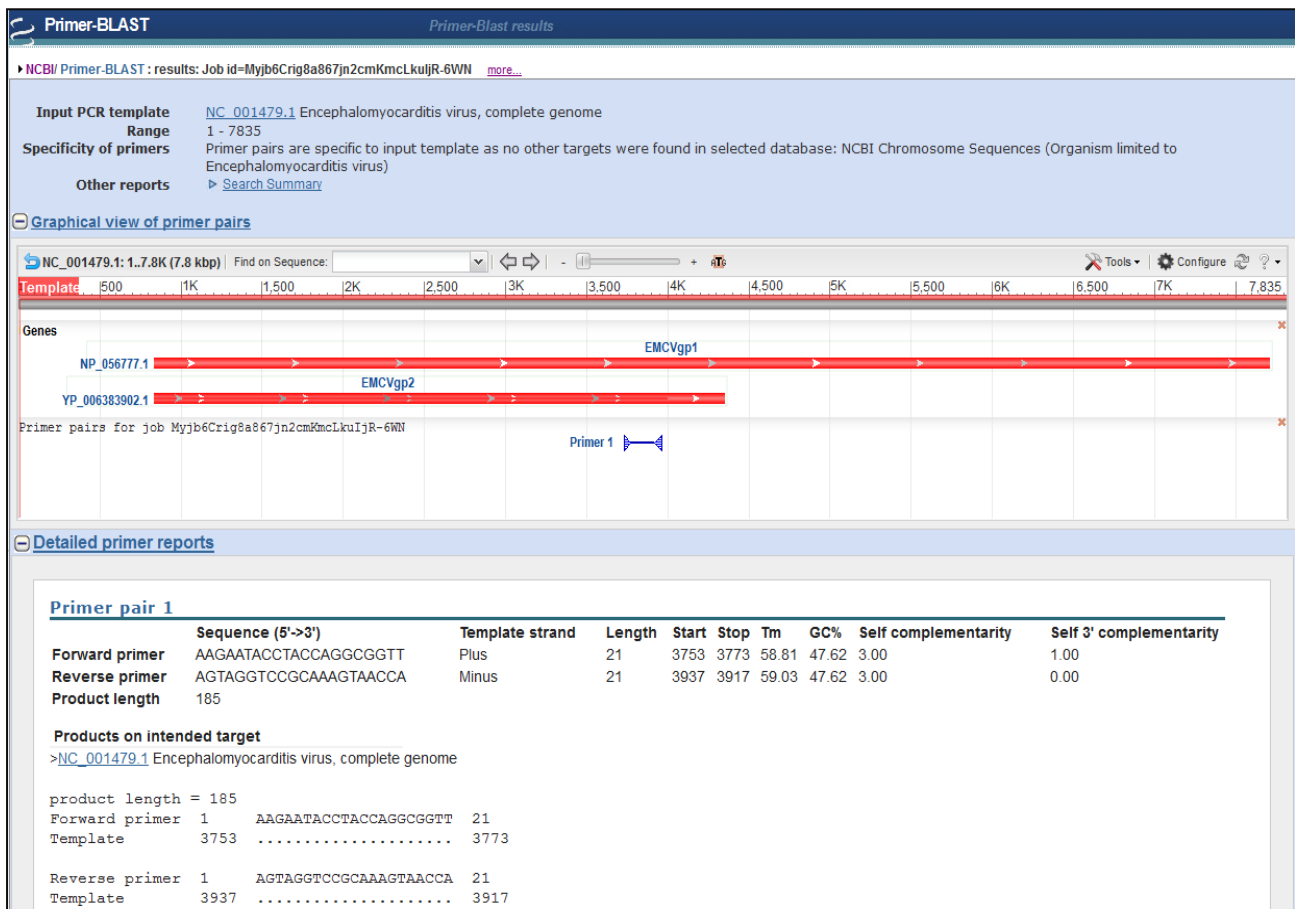


Figura 9. Diseño de oligonucleótidos para la proteína 2. Secuencia codificada en el gen "EMCVgp1" del EMCV, los resultados obtenidos fueron basados en los criterios para el buen diseño de oligonucleótidos (Tomada del *Primer-BLAST* del NCBI, 2014).

Los oligonucleótidos seleccionados flanquean un fragmento de 185 pb (Figura 10).

Fragmento amplificado: **185 pb**
 3753-
AAGAATACCTACCAGGCGGTCTAAGAGCAGAACCATGTAGAGTGACCATGGATATATATTATAAGAGAG
 TCAGGCCTTTTACTGCCCCCTGGTTCAGAAGGAATGGCCCGTGCGAGAGGAGAACGTTTTTCGGTTTTAC
 CGGATCTTCAATGCCCACTACGCTGGTTACTTTGCGGACCTACT-3937

Figura 10. Secuencia nucleotídica de la secuencia blanco del EMCV. El gráfico muestra en color amarillo el oligonucleótido sentido y en color gris el anti-sentido, los cuales generan un fragmento de 185 pb.

Por último, se realizó un segundo alineamiento de la región amplificada con la secuencia nucleotídica de cualquier organismo, esto con la finalidad de determinar la especificidad de la secuencia amplificada con el EMCV, utilizando la herramienta *BLAST Genomic* del NCBI (Figura 11), con una total identidad con el EMCV, así como con diversas cepas y variantes del mismo (Figura 12).

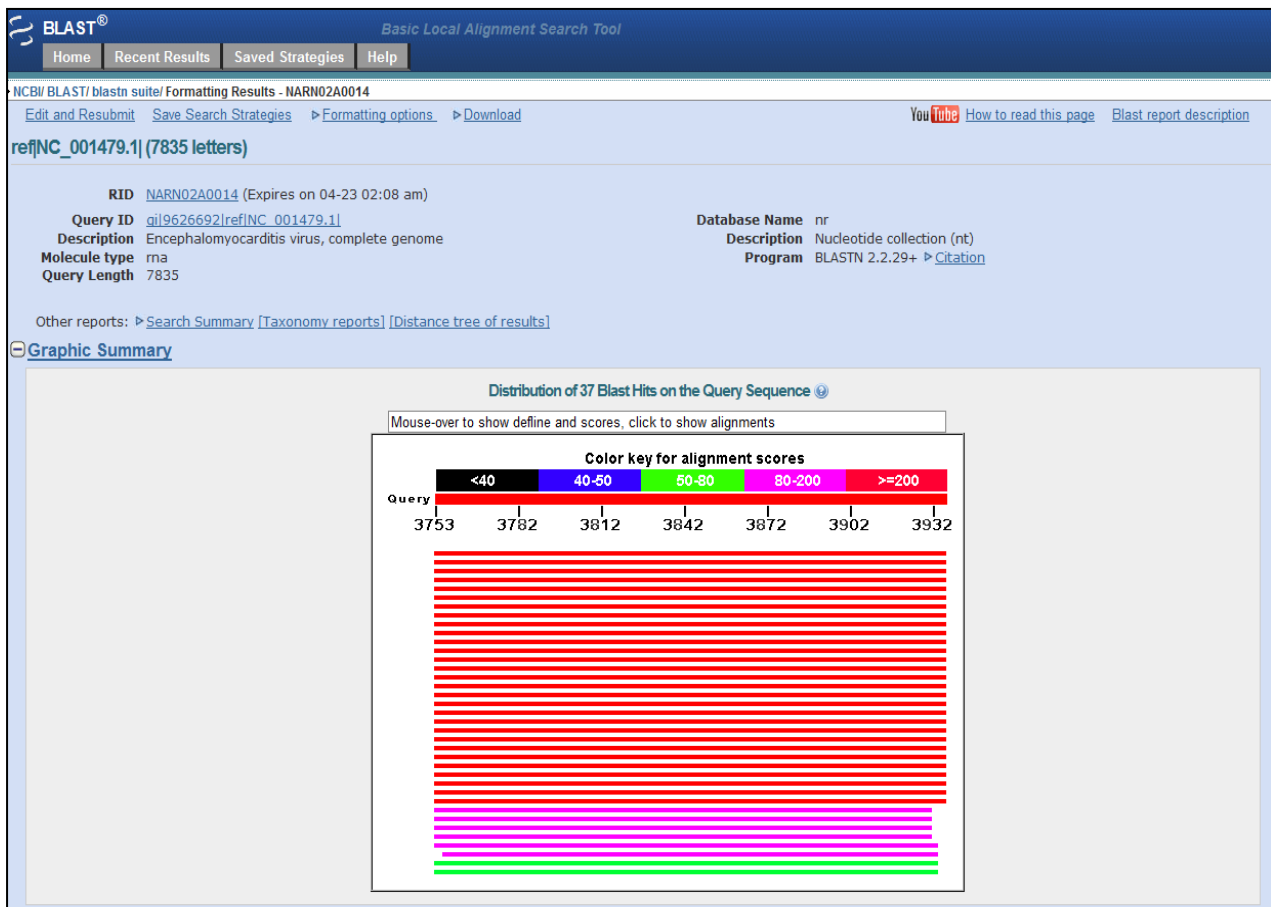


Figura 11. Comparativo de la secuencia blanco del EMCV con otras secuencias similares. El gráfico muestra un resumen de la similitud de 37 alineamientos con la secuencia blanco 2A-EMCV, el resultado fue obtenido mediante el uso de la herramienta en línea *BLAST Genomic* del NCBI (Tomada del NCBI, 2014).

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Encephalomyocarditis (EMC) viral RNA polyprotein coding region	334	334	100%	1e-88	100%	X00463.1
Encephalomyocarditis virus strain pEC9, complete genome	334	334	100%	1e-88	100%	DQ288856.1
Encephalomyocarditis virus polyprotein, complete cds	334	334	100%	1e-88	100%	M81861.1
Encephalomyocarditis virus complete RNA genome	329	329	100%	6e-87	99%	X74312.1
Encephalomyocarditis virus isolate YY13, complete genome	325	325	100%	7e-86	99%	KF836390.1
Encephalomyocarditis virus isolate YM13, complete genome	325	325	100%	7e-86	99%	KF836389.1
Encephalomyocarditis virus isolate JZ1203, complete genome	325	325	100%	7e-86	99%	KF836388.1
Encephalomyocarditis virus isolate JZ1202, complete genome	325	325	100%	7e-86	99%	KF836387.1
Encephalomyocarditis virus isolate HNUZ1201, complete genome	325	325	100%	7e-86	99%	KF836386.1
Encephalomyocarditis virus isolate HN13, complete genome	325	325	100%	7e-86	99%	KF771002.1
Encephalomyocarditis virus strain ZM polyprotein gene, complete cds	325	325	100%	7e-86	99%	KF598864.1
Encephalomyocarditis virus strain JX polyprotein gene, partial cds	325	325	100%	7e-86	99%	KF598863.1
Encephalomyocarditis virus strain XX3 polyprotein gene, partial cds	325	325	100%	7e-86	99%	KF598862.1
Encephalomyocarditis virus strain XX2 polyprotein gene, partial cds	325	325	100%	7e-86	99%	KF598861.1
Encephalomyocarditis virus strain BD2, complete genome	325	325	100%	7e-86	99%	KF709977.1
Encephalomyocarditis virus strain FJ13, complete genome	325	325	100%	7e-86	99%	KF293299.1
Encephalomyocarditis virus isolate BD2 polyprotein gene, complete cds	325	325	100%	7e-86	99%	KC762214.1
Encephalomyocarditis virus isolate HB10 polyprotein gene, complete cds	325	325	100%	7e-86	99%	JQ864080.1
Porcine encephalomyocarditis virus strain NJ08 polyprotein gene, complete cds	325	325	100%	7e-86	99%	HM641897.1
Encephalomyocarditis virus strain GXL, complete genome	325	325	100%	7e-86	99%	FJ897755.1
Encephalomyocarditis virus isolate K3, complete genome	325	325	100%	7e-86	99%	EU780148.1
Encephalomyocarditis virus strain GX0602 polyprotein mRNA, complete cds	325	325	100%	7e-86	99%	FJ604853.1
Encephalomyocarditis virus strain GX0601 polyprotein mRNA, complete cds	325	325	100%	7e-86	99%	FJ604852.1
Porcine encephalomyocarditis virus strain EMCV-CBNU polyprotein gene, complete cds	325	325	100%	7e-86	99%	DQ517424.1
Encephalomyocarditis virus strain HB1, complete genome	325	325	100%	7e-86	99%	DQ464063.1
Encephalomyocarditis virus strain BJC3, complete genome	325	325	100%	7e-86	99%	DQ464062.1
Encephalomyocarditis virus strain BEL-2887A/91, complete genome	325	325	100%	7e-86	99%	AF356822.1
Encephalomyocarditis virus strain XX1 polyprotein gene, partial cds	320	320	100%	3e-84	98%	KF598860.1
Encephalomyocarditis virus isolate K11, complete genome	316	316	100%	3e-83	98%	EU780149.1
Encephalomyocarditis virus complete genome	158	158	97%	2e-35	79%	X87335.1
Encephalomyocarditis virus, diabetogenic variant (D variant, ifp-phenotype) polyprotein mRNA, complete cds	158	158	97%	2e-35	79%	M37588.1
Encephalomyocarditis (EMC) virus EMC-D variant, RNA, complete genome	158	158	97%	2e-35	79%	M22458.1
Encephalomyocarditis (EMC) virus EMC-B variant, RNA, complete genome	158	158	97%	2e-35	79%	M22457.1
Encephalomyocarditis virus EMCV-30 polyprotein gene, complete cds	143	143	98%	5e-31	77%	AY296731.1
Encephalomyocarditis virus strain 1086C polyprotein gene, partial cds	107	107	96%	3e-20	73%	DQ835185.2
Mengo virus isolate Rz-pMwt, complete genome	77.0	77.0	98%	6e-11	69%	DQ294633.1
Mengo virus isolate M, complete genome	77.0	77.0	98%	6e-11	69%	L22089.1

Figura 12. Secuencias con alineamientos significativos con la secuencia blanco 2A-EMCV. En el gráfico se muestra que la secuencia solo presenta similitudes con otras secuencias pertenecientes a cepas y variantes del EMCV, el resultado fue obtenido mediante el uso de la herramienta en línea *BLAST Genomic* del NCBI (Tomada del NCBI, 2014).

Los oligonucleótidos diseñados fueron solicitados a la empresa mexicana T4Oligo y se reconstituyeron a una concentración de 100 µM, utilizando H₂O ultrapura.

6.2.2 Cepa del EMCV.

Para el EMCV se seleccionó la cepa de la ATCC® identificada con el número de referencia VR1479TM, la cual según la hoja de datos de la misma y los procedimientos de seguridad debe ser trabajada en un laboratorio de bioseguridad nivel 2. El EMCV requiere para su propagación células Vero (ATCC CCL-81) las cuales son células epiteliales adherentes provenientes de riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops* (ATCC, 2013).

El virus fue proporcionado en alícuotas a una concentración de 1×10^8 partículas/mL con medio de cultivo DMEM libre de células, este título viral fue calculado mediante el ensayo de infectividad TCID₅₀ (del inglés, *50% Tissue Culture Infective Dose*), el cual es la dosis infecciosa a la cual el 50% de los cultivos celulares inoculados presentan cambios patológicos y se expresa como TCID₅₀/mL.

6.2.3 Extracción del RNA viral del EMCV.

La extracción y purificación del RNA viral se realizó con el kit QIAamp Viral RNA de QIAGEN® protocolo de centrifugado (Anexo Protocolo 1), que permite la purificación del RNA viral en 140 µL de muestra libre de células, para su uso confiable en tecnologías de amplificación. Esta tecnología se basa en la unión selectiva a una membrana de gel de sílice y velocidades de centrifugación para el procesamiento de múltiples muestras simultáneas.

Las muestras son lisadas en condiciones altamente desnaturizantes que inactivan las enzimas RNasas asegurando el aislamiento de RNA viral intacto. Posteriormente se ajustan las condiciones de amortiguamiento que proporcionan la unión óptima del RNA a la membrana QIAamp® y se carga la muestra en la columna; mientras que el RNA se une a la membrana, los contaminantes se remueven eficientemente en dos etapas de lavados con dos diferentes soluciones amortiguadoras. Por último, el RNA se eluyó en 60 µL de agua ultrapura (Figura 13).

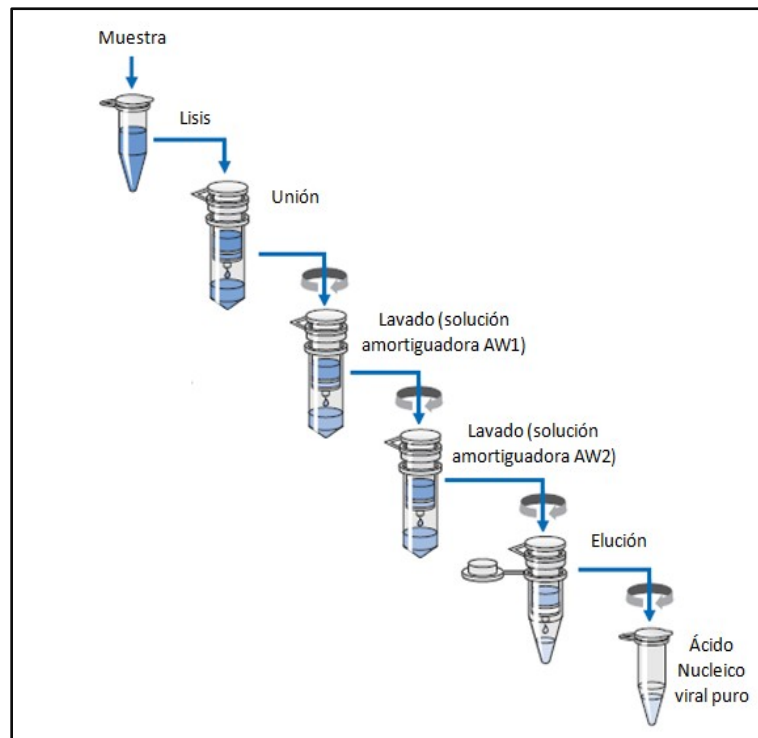


Figura 13. Protocolo de extracción de RNA viral por centrifugado. Tomada de QIAamp® Viral RNA Mini Handbook (QIAGEN®, 2007).

Posteriormente se cuantificó el RNA obtenido, utilizando el *Nanodrop 1000 Spectrophotometer*® de Thermo Scientific, con la aplicación de lectura de ácidos nucleicos (RNA-40) que permite medir la concentración y pureza del RNA. El espectrofotómetro fue calibrado con 1 µL de H₂O ultrapura, para posteriormente realizar la medición de la densidad óptica (DO) del RNA utilizando 1 µL de muestra. Por último, se realizaron los cálculos para obtener la concentración del RNA con la ecuación de Beer-Lambert, según el manual de usuario del *Nanodrop 1000*®:

$$C = (A \times e) / b$$

Donde “C” es la concentración de ácido nucleico en ng/µL, “A” es la absorbancia en AU, “e” es el coeficiente de extinción dependiente de la longitud de onda en ng-cm/µL (RNA-40 ng-cm/µL) y “b” es la longitud de la trayectoria en cm.

La pureza del RNA extraído se consideró adecuada cuando el cociente A_{260}/A_{280} se encontró entre 1.7-2 y el A_{260}/A_{230} entre 1.8-2.2.

6.2.4 Síntesis de DNA complementario (cDNA) mediante la enzima M-MLV RT.

Para la síntesis de cDNA se utilizó el kit de *M-MLV Reverse Transcriptase de Invitrogen*™, el cual utiliza la enzima retrotranscriptasa *M-MLV RT* (del inglés *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*) la cual es una polimerasa de DNA recombinante que sintetiza una cadena complementaria de DNA de hasta 7 Kb a partir de RNA de una sola hebra, DNA, o un híbrido de RNA: DNA.

El protocolo se basó en el inserto de la enzima retrotranscriptasa para un volumen de reacción de 20 μL (Anexo Protocolo 2), para la cual se utilizaron 10 μL de RNA, oligonucleótidos no específicos (500 nm), dNTPs (500 nm), *First Strand Buffer* (1X), DTT (0.01 M), inhibidor de RNasas llamado RNaseOUT™ (1 U), M-MLV RT (2 U) y por último H₂O ultrapura hasta completar el volumen de reacción de 20 μL .

6.2.5 PCR punto final para el EMCV.

Se calculó la temperatura de alineación o hibridación (T_m) de los oligonucleótidos utilizando la fórmula de Wallace *et al.* (1979), donde:

$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$$

La T_m resultante para ambos oligonucleótidos fue de 62 °C por lo que se procedió a realizar una amplificación en un gradiente de temperaturas de hibridación de los oligonucleótidos de 59-62 °C.

En cada reacción de PCR punto final de 25 μL (Anexo Protocolo 3) se utilizaron; 1.5 mM de MgCl₂, 10X *PCR Buffer* a una concentración de 1X, 0.2 mM de dNTPs, 0.4 μM del oligonucleótido sentido EMCV, 0.4 μM del oligonucleótido anti-sentido EMCV, 2.5 μL de cDNA, 0.02 U/ μL de la Taq Pol y por último se utilizó H₂O ultrapura hasta completar el volumen de reacción de 25 μL . Las muestras se amplificaron utilizando un termociclador VERITI® bajo las siguientes condiciones: 1) Desnaturalización inicial del DNA a 94 °C durante 3 min, 2) 35 ciclos repetidos con las siguientes condiciones: a) desnaturalización a 94 °C durante 45 s, b) alineación o hibridación de los oligonucleótidos al DNA a 59-62 °C en gradiente durante 30 s, c) extensión de la Taq polimerasa a 72 °C durante 1.5 min, 3) elongación final a 72 °C durante 10 min (Figura 14).

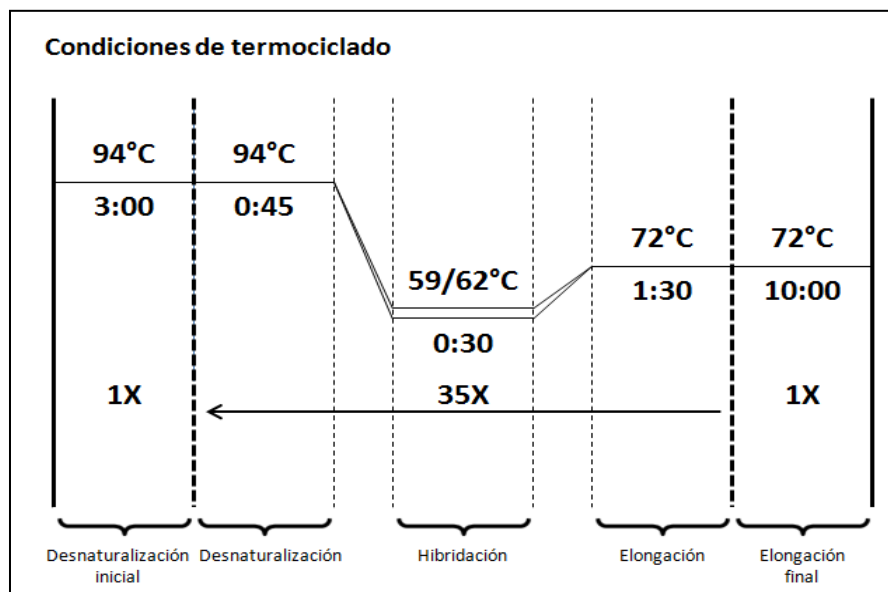


Figura 14. Condiciones de amplificación en gradiente de temperaturas de hibridación.

Posterior a la amplificación se realizó la identificación del fragmento amplificado mediante una electroforesis de los productos de la PCR en gel de agarosa al 1% con TBE 1X, teñido con 1 μL de SYBR

safe® de Invitrogen™ a una concentración de 1X y como marcador de peso molecular se utilizaron 3 µL del 1 Kb *Plus DNA Ladder* de Invitrogen™ a una concentración de 100 µg/µL. Por último el gel se visualizó utilizando el transiluminador de luz ultravioleta *Gel Doc™ EZ* de BIO-RAD.

6.2.6 Clonación TOPO 2.1®.

Con el fin de obtener un plásmido recombinante del EMCV se realizó el clonaje del producto de interés en el vector TOPO 2.1, mediante el TOPO® TA Cloning® Kit de Invitrogen™.

La clonación se llevó a cabo siguiendo el manual de usuario del TOPO® TA Cloning® Kit para células *Escherichia coli* quimiocompetentes (Anexo protocolo 4), que permite la inserción directa del producto amplificado por PCR mediante el uso de la enzima Taq polimerasa, la cual posee actividad transferasa terminal y añade una desoxiadenosina (A) a los extremos 3' terminales de los productos de PCR, mientras que el vector plasmídico TOPO 2.1® presenta un residuo terminal 3' desoxitimidina (T) que sobresale como extremo cohesivo para la clonación y se encuentra linealizado para mejorar la eficiencia de una transfección estable mediante dos Topoisomerasas I unidas covalentemente al vector, lo que permite que los extremos del vector y el producto amplificado sean complementarios y cohesivos (Figura 15).

Para la clonación se siguieron los siguientes pasos:

- Amplificación del producto deseado por PCR punto final (Anexo protocolo 3).
- Reacción de clonación del TOPO 2.1 (mezclar el producto de PCR y el vector TOPO®).
- Incubar 5 min a T.A.
- Transformar las células *E. coli* quimiocompetentes.
- Selección y análisis de colonias blanco-azul claro con el vector insertado.

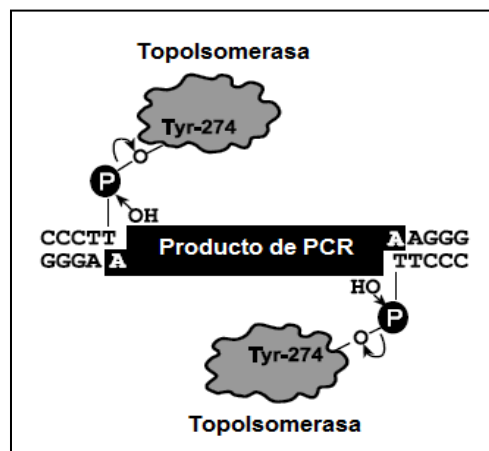


Figura 15. Plásmido vector TOPO® PCR™ 2.1 linealizado. El gráfico muestra el plásmido linealizado por medio de dos Topoisomerasas I del *Vaccinia virus*. Imagen tomada del Manual de usuario de TOPO® TA Cloning® Kit de Invitrogen™ (2012).

Como medio de cultivo se utilizó medio *Luria Bertani* (LB) a una concentración de 15.5 g/L, con kanamicina como antibiótico a 50 µg/mL y como compuesto reportero se adicionó el X-gal a 40 mg/mL el

cual es un indicador de las células que expresan la enzima β -galactosidasa, codificada en el gen lacZ del operón lac. El X-gal es hidrolizado por la β -galactosidasa y oxidado a 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, un compuesto azul insoluble, la secuencia recombinante se inserta aquí permitiendo distinguir entre las bacterias que no tienen la secuencia recombinante y pueden romper el X-gal presente en el agar del medio, tornándose sus colonias de color azul y las bacterias que han sido transformadas y no pueden procesar X-gal permaneciendo con su coloración blanca natural. La distribución del producto a clonar se muestra en el análisis del mapa del vector TOPO 2.1 (Figura 16).

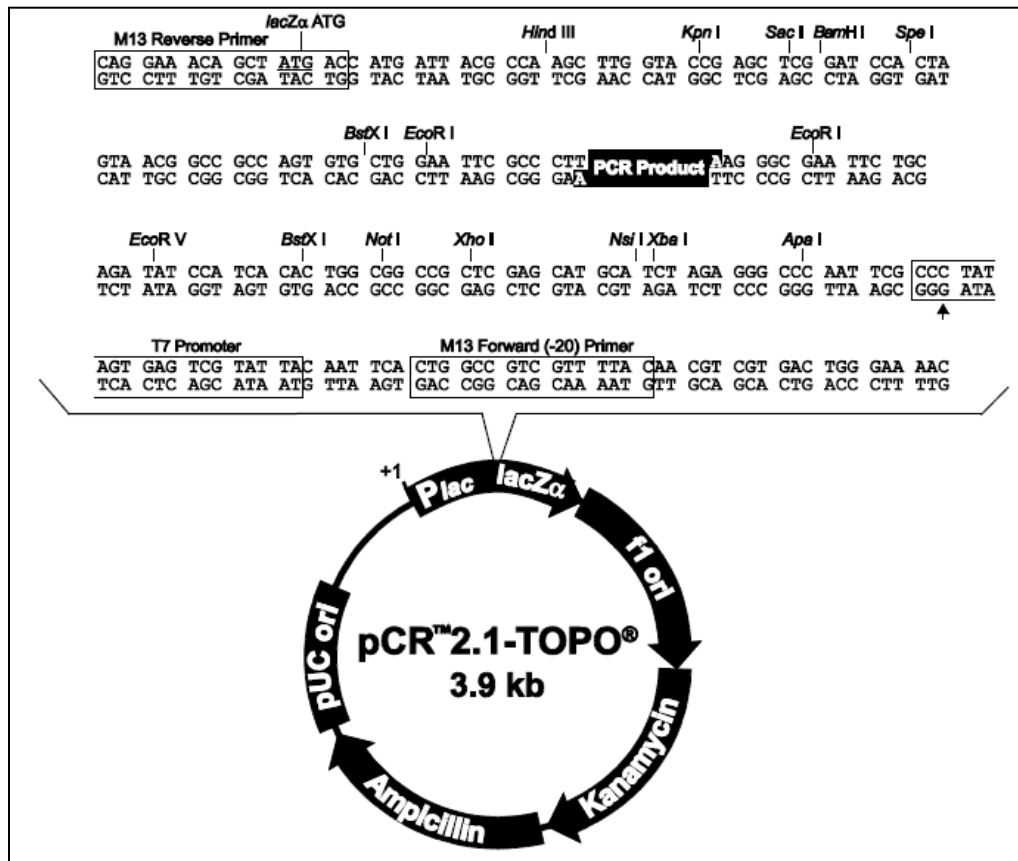


Figura 16. Mapa del vector de clonación pCRTM vector TOPO 2.1. El gráfico muestra los sitios de restricción de diversas enzimas y la distribución de los genes de resistencia y/o reportero. Imagen tomada del Manual de usuario de TOPO® TA Cloning® Kit de Invitrogen™ (2012).

Las bacterias transformadas se crecieron en medio de cultivo líquido LB con antibiótico Kanamicina, para así amplificar la cantidad del plásmido recombinante obtenido, el cual fue nombrado “pTOPO2.1-2AEMC”.


6.2.7 Purificación del plásmido recombinante.


Con el fin de obtener los plásmidos recombinantes “pTOPO2.1-2AEMC” libres de células o purificados se utilizó el kit *GeneJet™ Plasmid Miniprep* de Fermentas, que permite aislar plásmidos de DNA de cultivos de *E. coli* recombinantes en 1 a 5 mL de muestra utilizando una columna de centrifugación con una membrana a base de sílice.


El protocolo se llevó a cabo siguiendo el manual se usuario del *kit GeneJet™* (Figura 17) con 2 mL de muestra de las colonias transformadas en medio de cultivo.

GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit

Nota: Todos los pasos deben llevarse a cabo a temperatura ambiente.
Las centrifugaciones deben realizarse con microcentrifuga a > 12000 xg (~11000 rpm)

1  **Resuspender las células, lisar y Neutralizar**
 Añadir a las células sedimentadas:
 250µL de Solución de Resuspensión con (RNasa A) y agitar.
 250µL de Solución de lisis y Homogenizar por inversión de 4-6 veces
 350µL de Solución de Neutralización y homogenizar por inversión de 4-6 veces.
 Centrifugar 5 min

2  **Unión del ADN**
 Cargar el sobrenadante a la columna de centrifugación GeneJet™.
 Centrifugar 1 min

3  **Lavar la columna**
 Agregar 500µL de solución de lavado y centrifugar por 30-60s } Repetir dos veces
 Desechar el filtrado
 Centrifugar la columna vacía durante 1 min.


4  **Eluir el ADN purificado**
 Agregar 50µL de buffer de elución a la columna e incubar por 2 min.
 Centrifugar 2 min.
 Colectar el filtrado.

Figura 17. Purificación de DNA plasmídico por Miniprep.

Imagen tomada del Manual de usuario de GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (2006).

Por último, se cuantificó la concentración obtenida mediante el *Nanodrop 1000 Spectrophotometer®* de Thermo Scientific, utilizando la aplicación de lectura de ácidos nucleicos (DNA-50) y como blanco 1 µL de H₂O ultrapura. El cálculo de la concentración fue realizado como se describió anteriormente.

6.2.8 Análisis del plásmido pTOPO2.1-2AEMC por electroforesis y secuenciación.

Se utilizaron 50 ng de DNA de los plásmidos obtenidos para llevar a cabo una PCR punto final (Anexo protocolo 3), utilizándose como control positivo cDNA del virus y como control negativo o NTC (del inglés *No Template Control*) H₂O ultrapura.

Posteriormente, se realizó la digestión del pTOPO2.1-2AEMC mediante la enzima *EcoRI* de Invitrogen™, la cual presentan su sitio de corte en sitios de restricción específicos (Figura 18) pertenecientes a secuencias palindrómicas definidas en el mapa de restricción del TOPO 2.1®.

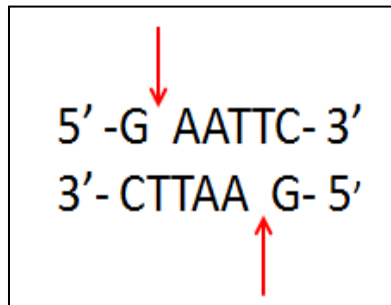


Figura 18. Sitios de restricción de la enzima *EcoRI*. La figura señala los sitios de corte con flechas rojas (Tomada de Inserto de la enzima *EcoRI* de Invitrogen™)

Para la reacción de digestión de 20 μL se utilizaron los componentes basados en el inserto de la enzima *EcoRI* de Invitrogen™, utilizando 14 μL del pTOPO2.1-2AEMC (2 μg), la enzima *EcoRI* (0.5 U), el reactivo *buffer* 3 para la enzima (1X) y H_2O ultrapura a completar el volumen de 20 μL . La reacción se incubó a 37 °C durante 1:30 h y terminada la incubación se colocó el tubo inmediatamente en hielo.

Para analizar los productos obtenidos de la PCR punto final y de la digestión con la enzima *EcoRI*, se realizó un gel de agarosa al 1% con TBE (1X), teñido con SYBR safe (1X), en el cual se cargaron los productos, para ser separados por cargas eléctricas en un corrimiento electroforético por 1:45 h a 100 V constantes.

Por último, se secuenciaron 10 μL de DNA plasmídico pTOPO2.1-2AEMC (concentración mínima de 120 $\text{ng}/\mu\text{L}$) en el CINVESTAV Irapuato, con la finalidad de evaluar el porcentaje de identidad de la secuencia de insertada en el vector pTOPO2.1 (185 pb) con la secuencia teórica del NCBI. Los resultados de secuenciación de LANGE BIO fueron analizados con ayuda de la herramienta en línea *BLAST* del NCBI, alineando estas secuencias con la secuencia consenso del EMCV.

6.3 Determinación del rango dinámico de la qPCR para el EMCV.

Para la validación de una prueba que garantice la seguridad viral de los productos biotecnológicos es de suma importancia establecer los límites de detección, los cuales son definidos como la cantidad mínima de un analito que puede ser detectado, aunque no necesariamente cuantificado. Así mismo, es necesario establecer el límite o intervalo de cuantificación de la prueba, referido como la cantidad más baja y más alta de un analito que puede ser determinada cuantitativamente con precisión y exactitud.

Para la qPCR se utilizó el *LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I* de Roche, el cual incluye la enzima Taq Polimerasa y utiliza como reportero el fluorocromo *SYBR Green I* para la detección y cuantificación de cualquier secuencia definida de DNA con gran sensibilidad.

En el establecimiento del rango dinámico de detección se comenzó por definir el límite superior de detección, con base en el hecho de que cantidades muy altas de DNA molde pueden reducir la señal de

fluorescencia, haciendo que la muestra quede fuera del rango de detección, por lo que se prepararon cinco diluciones (50 ng/μL, 25 ng/μL, 10 ng/μL, 5 ng/μL y 1 ng/μL) a partir del DNA plasmídico del pTOPO2.1-2AEMC a una concentración de 148.6 ng/μL, estas diluciones fueron preparadas a un volumen final de 50 μL utilizando H₂O ultrapura.

Posteriormente, se preparó la reacción para amplificar las muestras por qPCR (Anexo Protocolo 5) utilizando 2 μL de la dilución elaborada a partir del plásmido pTOPO2.1-2AEMC, oligonucleótido sentido EMCV (0.4 μM), oligonucleótido anti-sentido EMCV (0.4 μM), *LightCycler Master mix* (1X) y H₂O ultrapura para completar el volumen de reacción. Mientras que para la amplificación se utilizó el termociclador *Carrusel-LightCycler*[®] versión 1.5 de Roche, el cual incorpora un lector de fluorescencia de capilares específico para la longitud de onda del *SYBR Green* (530 nm) usando el *software LightCycler* 3.5.3.

Las condiciones del programa del termociclador (Tabla 4) se basaron en la guía de usuario del *LightCycler*[®]:

- **Pre-incubación** para la desnaturalización del DNA.
- **Amplificación** del DNA molde.
- **Curvas de fusión** para la identificación del producto de PCR/ análisis del amplicón.
- **Enfriamiento** del rotor y de la cámara termal.

Tabla 4. Condiciones de amplificación para la qPCR. Los parámetros están establecidos para el *Carrusel-LightCycler*[®] instrument, según el inserto del *LightCycler*[®] FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I (2011).

Modo de análisis	Ciclos	Segmentos	Temperatura objetivo	Tiempo de mantenimiento	Modo de adquisición
Pre-Incubación					
Ninguno	1	95 °C	10 min	10 min	Ninguno
Amplificación					
Cuantificación	45	Desnaturalización	95 °C	10 s	Ninguno
		Alineación	Dependiendo del oligonucleótido	20 μL: 0-10s 100 μL: 30-45 s	Ninguno
		Extensión	72 °C	10 s	Individual
Curva de Fusión					
Curvas de fusión	1	Desnaturalización	95 °C	0 s	Ninguno
		Alineación	65 °C	60 s	Ninguno
		Fusión	95 °C rampa= 0.1 °C/s	0 s	Continuo
Enfriamiento					
Ninguno	1		40 °C	30 s	Ninguno

*La lectura es llevada a cabo usando el canal 3 del software del *Carrusel-LightCycler*[®] instrument de Roche[®].

Posteriormente, para establecer el límite inferior de detección se utilizó la concentración de DNA plasmídico de 5 ng establecida como el límite superior de detección del equipo y a partir de esta concentración se realizaron 10 diluciones seriales (1:10) a un volumen final de 50 μL usando H₂O ultrapura como diluyente. Posteriormente, se preparó la reacción para amplificar las muestras por qPCR (Anexo Protocolo 5) y se utilizaron 2 μL de la dilución elaborada a partir del plásmido pTOPO2.1-2AEMC, oligonucleótido sentido EMCV (0.4 μM), oligonucleótido anti-sentido EMCV (0.4 μM), *LightCycler Master mix* (1X) y H₂O ultrapura, para completar el volumen de reacción. Las condiciones de amplificación

fueron las mencionadas previamente (Tabla 4), las cuales fueron programadas en el *Carrusel-LightCycler® instrument* como se muestra en la Figura 19.

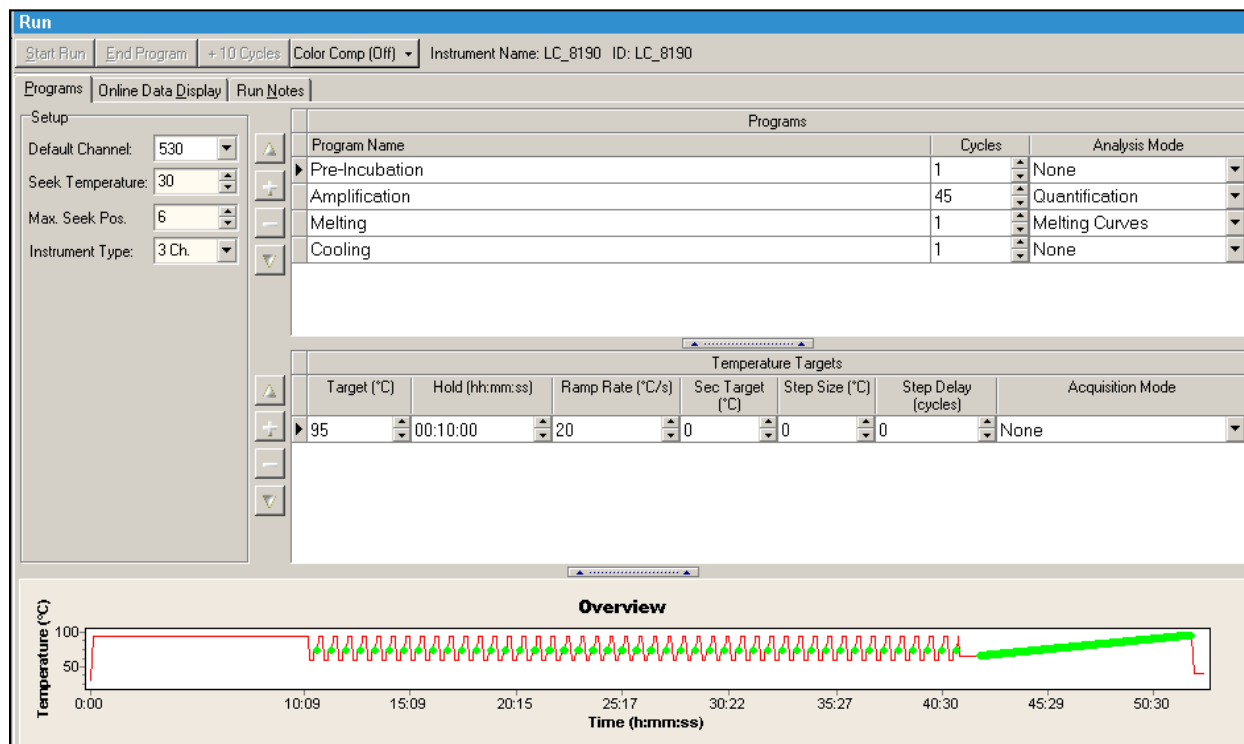


Figura 19. Programa de amplificación del Light Carrusel-LightCycler® instrument.

El límite inferior es establecido en la última concentración que se desdobra correctamente, ajustándose a la regresión lineal, elaborada con los Puntos de cruce (C_p) de cada dilución.

Por último, con el rango dinámico de detección establecido, se procedió a realizar la curva estándar basada en diluciones seriales logarítmicas (1:10) del límite superior de detección hasta el límite inferior; esta curva estándar permite obtener una regresión lineal donde se interpolan los valores de C_p de las muestras de concentración desconocida para así obtener su concentración. El eje "x" representa el logaritmo de la concentración de DNA inicial, mientras que el eje "y" representa los C_p correspondientes a la concentración de DNA.

6.4 Cuantificación absoluta de partículas virales del EMCV por qPCR.

Para realizar la cuantificación absoluta se realizaron a partir del título viral (1×10^8 partículas/mL) 4 diluciones (1×10^7 , 1×10^5 , 1×10^3 , 1×10^2 partículas/mL), las cuales fueron diluidas en un producto biotecnológico de prueba a un volumen final de 140 μ L.

Posteriormente, las muestras fueron purificadas utilizando el *kit QIAamp Viral RNA* de QIAGEN® protocolo de centrifugado (Anexo Protocolo 1), que permite la purificación del RNA viral en 140 μ L de una muestra libre de células, para su uso confiable en tecnologías de amplificación. El RNA por último se eluyó en 20 μ L de agua ultrapura.

Una vez obtenido el RNA se procedió a realizar la síntesis de cDNA mediante el kit de *M-MLV Reverse Transcriptase* de Invitrogen™, el cual utiliza la enzima retrotranscriptasa del virus de la leucemia murina (M-MLV RT). El protocolo se basó en el inserto de la enzima retrotranscriptasa para un volumen de reacción de 20 µL (Anexo Protocolo 2), para la cual se utilizaron 10 µL de RNA, oligonucleótidos no específicos (500 nm), dNTPs (500 nm), *First Strand Buffer* (1X), DTT (0.01 M), el inhibidor de RNasas *RNaseOUT*™ (1 U), *M-MLV RT* (2 U) y por último H₂O ultrapura a completar el volumen de reacción de 20 µL.

Con el cDNA sintetizado previamente, se procedió a preparar las reacciones para la amplificación de las muestras problema preparadas a partir del producto biotecnológico de prueba (dilución 1×10^7 , 1×10^5 , 1×10^3 , 1×10^2 partículas/mL) utilizando en cada reacción de qPCR (Anexo Protocolo 5) 2 µL de la muestra/curva estándar, oligonucleótido sentido EMCV (0.4 µM), oligonucleótido anti-sentido EMCV (0.4 µM), *LightCycler Master mix* (1X) y H₂O ultrapura para completar el volumen de reacción de 12 µL. Así mismo, se prepararon las reacciones como se mostró previamente, para los puntos de la curva estándar que abarcan el rango dinámico de cuantificación, esto con la finalidad de poder interpolar los valores de las muestras problema y así realizar la cuantificación absoluta de la concentración del DNA viral. Las condiciones de amplificación fueron las mencionadas previamente (Tabla 4) para el *Carrusel-LightCycler*® instrument.

Por último los productos amplificados fueron observados por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, con TBE 1X, teñido con 1 µL de *SYBR safe*® (1X) de Invitrogen™, usando como marcador de peso molecular el 1 Kb *Plus DNA Ladder* (100 µg) de Invitrogen™, el gel se visualizó utilizando el transiluminador de luz ultravioleta *Gel Doc*™ EZ de BIO-RAD. Los resultados fueron analizados con la finalidad de contrastarlos con los obtenidos por la qPCR.

VII. RESULTADOS

7.1 Obtención de un plásmido recombinante “pTOPO2.1-2A-EMCV”

La extracción del RNA, obtenida con el *kit QIAamp Viral RNA* de QIAGEN®, produjo una adecuada concentración de RNA viral al ser cuantificado por el *Nanodrop 1000 Spectrophotometer*® de *Thermo Scientific* (Tabla 5).

Tabla 5. Cuantificación del RNA total extraído del EMCV.

RNA viral (Virus EMCV)						
Absorbancia (A)				Pureza		Concentración
Abs	A-260 10 mm path	A-280 10 mm path	A-230 10 mm path	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	(ng/μL)
3.581	3.098	1.63	1.7	1.90	1.822	154.9

Una vez sintetizado el cDNA se procedió a realizar la PCR en gradiente, posteriormente los productos se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%, con el fin de observar y seleccionar la mejor temperatura de alineación o hibridación (T_m) para los oligonucleótidos diseñados. Se puede observar (Figura 20) que no hay diferencias significativas entre la intensidad de la banda esperada (185 pb) del EMCV a 59 °C (T_m por el proveedor) y 62 °C (T_m calculada). Sin embargo se seleccionó la temperatura de 59 °C ya que es la calculada por el recurso en línea *Primer-BLAST* del NCBI, el cual utiliza un algoritmo más complejo y confiable para el cálculo de la T_m de los oligonucleótidos y a su vez estaría en el rango recomendado de 55-60 °C para aplicaciones de qPCR según Tevfik (2006).

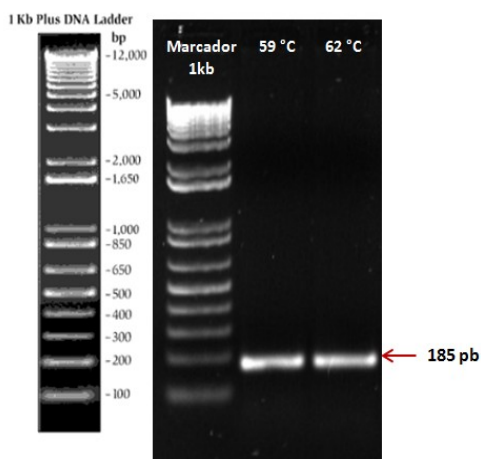


Figura 20. Electroforesis de los productos de PCR en gradiente. En el gel se puede observar el fragmento esperado de 185 pb mediante la comparación con el marcador de peso molecular *1kb Plus DNA Ladder* (100 μg). Así mismo, se observa que no hay diferencias significativas entre el producto obtenido a 59 y 62 °C, el del es de agarosa 1%, teñido con *SYBR safe* (1X), corrida a 100 volts (V) por 1 h.

Una vez estandarizada la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos, se procedió a amplificar el producto de 185 pb del EMCV, con la finalidad de tener suficientes copias del fragmento a clonar en el vector plasmídico TOPO 2.1. Una vez que se realizó la clonación el constructo génico obtenido fue insertado en bacterias de *E. coli* quimiocompetentes, las cuales se sembraron en una placa de medio LB, antibiótico Kanamicina y Xgal. Obteniendo siete colonias transformadas de las cuales tres fueron recombinantes (colonias blancas). Se obtuvo una eficiencia de transformación de 14 cfu/ μ g (Figura 21).

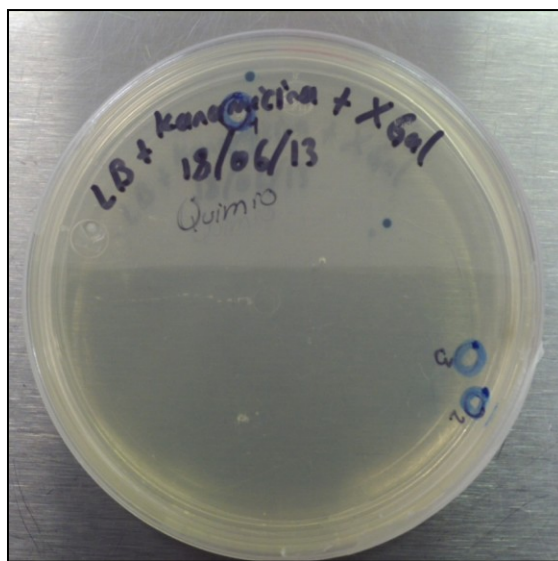


Figura 21. Colonias recombinantes de *E. coli*. En la placa se muestra con un círculo azul las tres colonias blancas (recombinantes) obtenidas y las colonias azules no recombinantes.

Las tres colonias obtenidas (EMC-1, EMC-2, EMC-3) fueron crecidas de manera independiente en medio líquido LB a un volumen de 5 mL y posteriormente en un volumen de 45 mL, con el fin de obtener una gran cantidad de bacterias y por ende de DNA plasmídico para su posterior purificación, análisis por electroforesis y secuenciación.

Para la purificación del plásmido recombinante de las tres colonias obtenidas se utilizó el *kit GeneJET™ Plasmid Miniprep*. Posteriormente, se cuantificó el DNA purificado con el *Nanodrop 1000 Spectrophotometer®* de Thermo Scientific y se observó su pureza e integridad (Tabla 6).

Tabla 6. Cuantificación del DNA plasmídico purificado.

Muestra	DNA plasmídico						
	Absorbancia (A)			Pureza		Concentración	
Colonia	Abs	A-260	A-280	A-230	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	(ng/ μ L)
EMC-1	1.665	2.973	1.582	1.66	1.88	1.79	148.6
EMC-2	2.333	3.595	1.930	2.3	1.86	1.54	179.7
EMC-3	1.631	2.895	1.511	1.63	1.92	1.77	144.8

Una vez purificado el DNA plasmídico se realizó una PCR punto final (Anexo Protocolo 2) para la amplificación del fragmento de interés (185 pb) presente en el pTOPO2.1-2A-EMC de cada colonia

recombinante, usando 1.5 mM de $MgCl_2$, 10X PCR Buffer a una concentración de 1X, 0.2 mM de dNTPs, 0.4 μ M del oligonucleótido sentido EMCV, 0.4 μ M del oligonucleótido anti-sentido EMCV y 50 ng del DNA plasmídico. Para la visualización del fragmento de interés (185 pb) se realizó un corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1% (Figura 22).

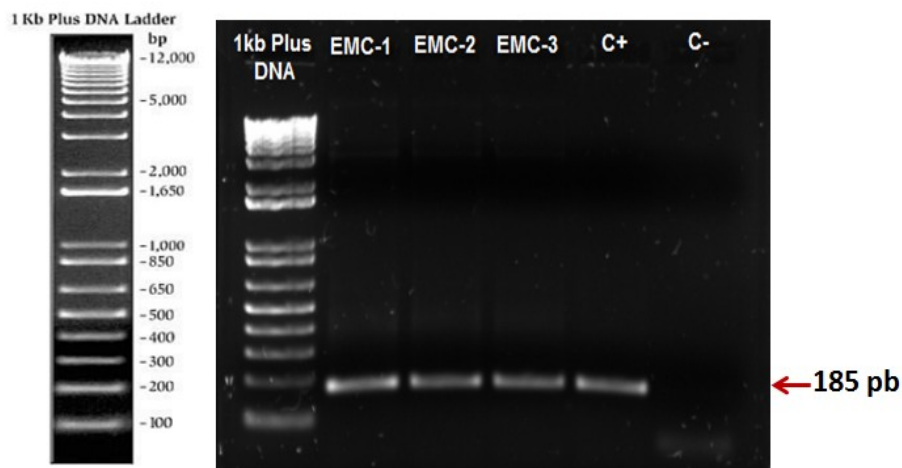


Figura 22. Electroforesis de los amplicones del DNA plasmídico purificado. En el gel se observa la amplificación del producto de interés (185 pb) a partir del DNA plasmídico extraído de las tres colonias recombinantes (EMC-1, EMC-2, EMC-3), así mismo, se muestra como control positivo usando el cDNA del EMCV (C+) y el control negativo que contiene H_2O ultrapura (C-), los fragmentos amplificados fueron comparados con el marcador de peso molecular *1kb Plus DNA Ladder* a una concentración de 100 μ g/ μ L. (Gel de agarosa 1%, teñido con *SYBR safe* (1X), corrida a 100 V por 1 h)

Para comprobar que el plásmido “pTOPO2.1-2A-EMC” tuviera la inserción del fragmento de DNA que corresponde a la secuencia del EMCV seleccionada (185 pb), se realizó una PCR con los oligonucleótidos sentido y anti-sentido EMCV para el DNA plasmídico, el cDNA del EMCV como control positivo (C+) y para el control negativo con agua ultra pura (C-). Posteriormente se realizó la digestión del plásmido “pTOPO2.1-2A-EMC” con la enzima *EcoRI*.

Los productos obtenidos de la PCR y de la digestión fueron visualizados en un gel de agarosa por electroforesis, junto con el DNA plasmídico puro sin digerir (Figura 23).

Una vez que se comprobó por electroforesis que el fragmento del EMCV de interés (185 pb) estaba presente en el DNA plasmídico, se mandaron a secuenciar 10 μ L del DNA plasmídico de las tres clonas (EMC-1, EMC-2, EMC-3) al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) esto con el fin de comprobar la identidad de la secuencia obtenida (Figura 24).

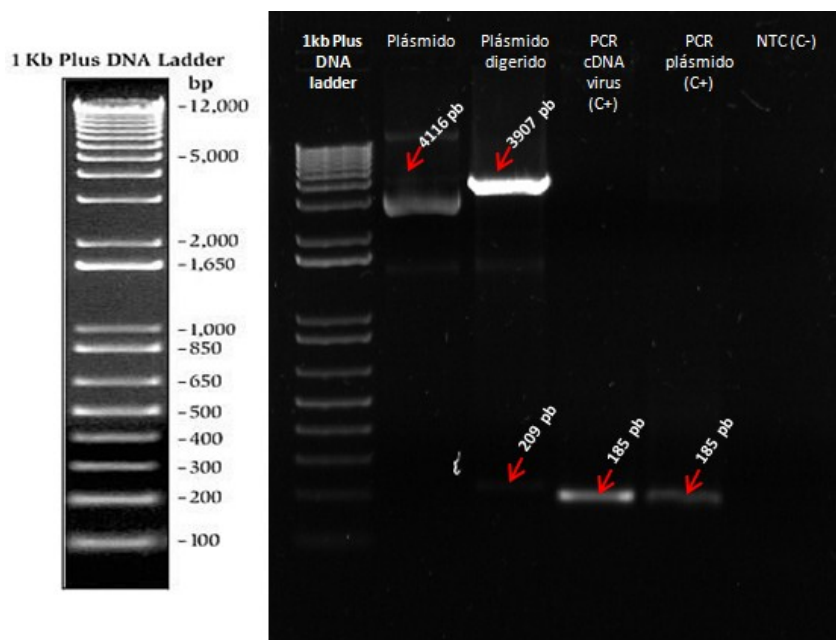


Figura 23. Electroforesis del plásmido recombinante pTOPO2.1-2A-EMC. El gel muestra que se obtuvo el tamaño de bandas esperadas y la correcta clonación del plásmido: 1) Plásmido sin digerir 4116 pb (3931 pb+185 pb); 2) Plásmido digerido mostrando la banda del plásmido con 3907 pb y la banda del producto insertado de 209 pb (185 pb+24 pb) ya que incorpora las bases del sitio de restricción de la enzima *EcoRI*; 3) PCR del cDNA del virus (185 pb); 4) PCR del DNA plasmídico (185 pb); 5) Control negativo o NTC. (Gel de agarosa 1%, teñido con SYBR safe® 1X, corrimiento 1.45 h a 100 V).

CLONA: EMC-1, pU, pCR2.1-TOPO, CD, 09 DE OCTUBRE DEL 2013

SITIO: *EcoRI*, GAATTC + GCCCTT, POSICION: 1-6 + 7-12

SITIO FINAL: AAGGGC + GAATTC, POSICION: 198-203 + 204-209

5' AGTAGGTCGCAAAGTAACCA 3'

GAATTCGCCCTT AAGAATACCTACCAGGCGGTTCTAAGAGCAGAACCATGTAGAGTGACCATGG
ATATATACTATAAGAGAGTCAGGCCTTTAGACTGCCCCTGGTTCAGAAGGAATGGCGCGTGCG
AGAGGAGAACGTTTTTCGGTTTGACCGGATCTCAATGCCACTACGC TGGTTACTTTGCGGAC
CTACTAAGGGCGAATTC

CLONA: EMC-2, pU, pCR2.1-TOPO, CD, 09 DE OCTUBRE DEL 2013

SITIO: *EcoRI*, GAATTC + GCCCTT, POSICION: 1-6 + 7-12

SITIO FINAL: AAGGGC + GAATTC, POSICION: 198-203 + 204-209

GAATTCGCCCTT AGTAGGTCGCAAAGTAACCA GCGTAGTGGGCATTGAAGATCCGGTACAAAC
CGAAAACGTTCTCCTCTCGCACGCGCCATTCTTCTGAACCAGGGGCAGTCTAAAAGGCCTGAC
TCTCTTATAGTATATATCCATGGTCACTCTACATGGTCTGCTCTTAG AACCGCCTGGTAGGTATT
CTTAAGGGCGAATTC

CLONA: EMC-3, pU, pCR2.1-TOPO, CD, 09 DE OCTUBRE DEL 2013

SITIO: *EcoRI*, GAATTC + GCCCTT, POSICION: 1-6 + 7-12

SITIO FINAL: AAGGGC + GAATTC, POSICION: 198-203 + 204-209

GAATTCGCCCTT AGTAGGTCGCAAAGTAACCA GCGTAGTGGGCATTGAAGATCCGGTACAAAC
CGAAAACGTTCTCCTCTCGCACGCGCCATTCTTCTGAACCAGGGGCAGTCTAAAAGGCCTGAC
TCTCTTATAGTATATATCCATGGTCACTCTACATGGTCTGCTCTTAG AACCGCCTGGTAGGTATT
CTTAAGGGCGAATTC

Figura 24. Resultados de la secuenciación del DNA plasmídico. Se muestran los resultados obtenidos del DNA plasmídico extraído de las clonas EMC-1, EMC-2 y EMC-3, en donde se resalta en amarillo los sitios de restricción de la enzima *EcoRI* y en azul las secuencias de los oligonucleótidos EMCV sentido y anti-sentido.

Posteriormente se realizó el análisis del porcentaje de identidad de los fragmentos secuenciados comparándolos con la secuencia teórica esperada del EMCV obtenida en el *GenBank* del NCBI mediante la herramienta en línea *BLAST* en la cual se alinearon y compararon ambas secuencias, esperando obtener un porcentaje de al menos un 98% de identidad.

Del análisis de la secuencia teórica esperada y de la secuencia perteneciente al EMC-1 se obtuvo un 99% de identidad (Figura 25).

Sequence ID: C 55033 Length: 185 Number of Matches: 1					
Range 1: 1 to 185 Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
331 bits(179)	4e-96	183/185(99%)	0/185(0%)	Plus/Plus	
Query 3753	AAGAATACCTACCAGGCGGTTCTAAGAGCAGAACCATGTAGAGTGACCATGGATATATAT				3812
Sbjct 1	AAGAATACCTACCAGGCGGTTCTAAGAGCAGAACCATGTAGAGTGACCATGGATATATAC				60
Query 3813	TATAAGAGAGTCAGGCCTTTTAGACTGCCCTGGTTCAGAAGGAATGGCCCGTGCGAGAG				3872
Sbjct 61	TATAAGAGAGTCAGGCCTTTTAGACTGCCCTGGTTCAGAAGGAATGGCCCGTGCGAGAG				120
Query 3873	GAGAACGTTTTTCGGTTTGTACCGGATCTTCAATGCCCACTACGCTGGTTACTTTGCGGAC				3932
Sbjct 121	GAGAACGTTTTTCGGTTTGTACCGGATCTTCAATGCCCACTACGCTGGTTACTTTGCGGAC				180
Query 3933	CTACT				3937
Sbjct 181	CTACT				185

Figura 25. Análisis de identidad de la secuencia clonada con la secuencia teórica esperada. La figura muestra el resultado del comparativo entre la secuencia teórica y el fragmento secuenciado del DNA plasmídico extraído de la colonia EMC-1, obteniendo como resultado un 99% de identidad. El análisis se realizó usando la herramienta en línea *BLAST* de NCBI.

El mismo resultado fue observado con el comparativo de la secuencia teórica y las secuencias de los fragmento de interés del EMC-2 y EMC-3 secuenciados.

7.2 Establecimiento del rango de detección y cuantificación para el EMCV.

De las diluciones de DNA plasmídico elaboradas para establecer el límite superior de detección se seleccionó la correspondiente a 5 ng, ya que con la concentración de 50 ng la curva se saturó muy rápidamente provocando la ausencia de la fase exponencial en la curva estándar y por lo tanto que no se logrará establecer el valor de C_p correspondiente y por consiguiente su concentración (Figura 26).

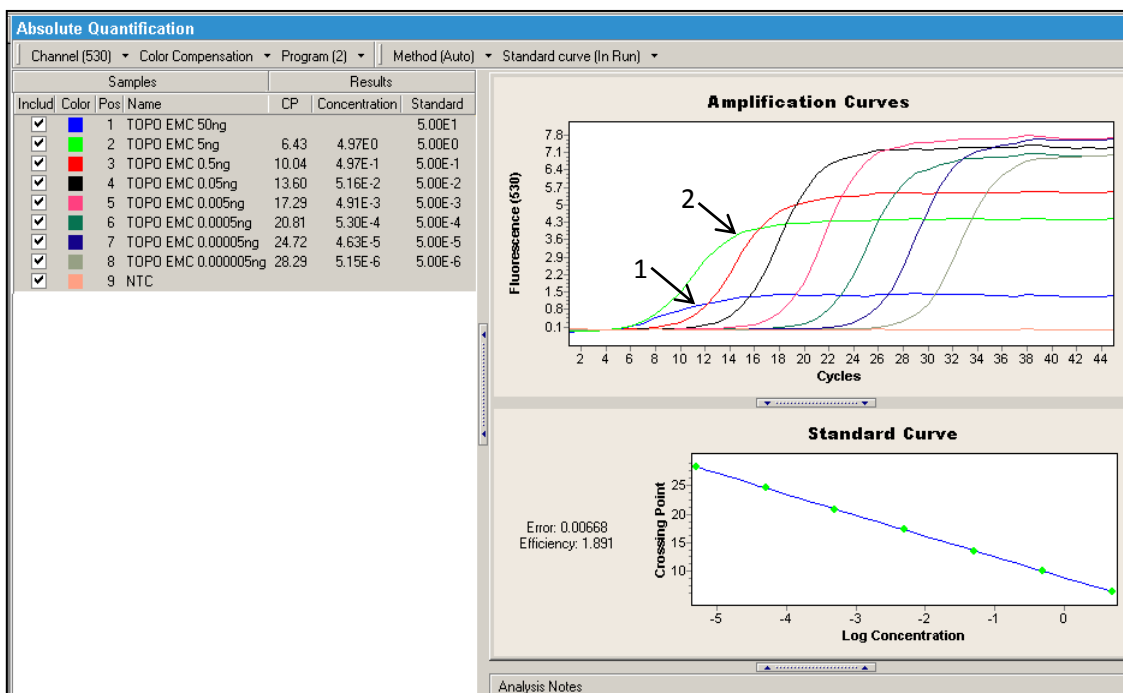


Figura 26. Límite superior de detección y cuantificación para la qPCR del EMCV. 1) DNA plasmídico a una concentración de 50 ng, donde se observa saturación de la reacción, lo cual impide que haya presencia de una fase exponencial que permita establecer el valor de C_p y su concentración; 2) DNA plasmídico a una concentración de 5 ng, con un C_p de 6.43, el cual representa límite superior de detección y a la vez el límite superior de cuantificación.

Una vez establecido el límite superior de detección y cuantificación se realizaron 10 diluciones seriales logarítmicas (1:10), con el fin de establecer el límite inferior de detección y cuantificación.

El límite inferior de detección fue establecido por el estándar de 5 ag (5×10^{-18} ng), mientras que el límite inferior de cuantificación o límite en el que el equipo aún realiza un correcto desdoblamiento de la cantidad/concentración de DNA, corresponde al estándar con una concentración de 500 ag (5×10^{-16} g), ya que a partir de esta dilución la curva estándar ya no se separa adecuadamente, provocando que la cuantificación de la concentración/partículas virales del EMCV a partir de este punto no sea exacta (Figura 27).

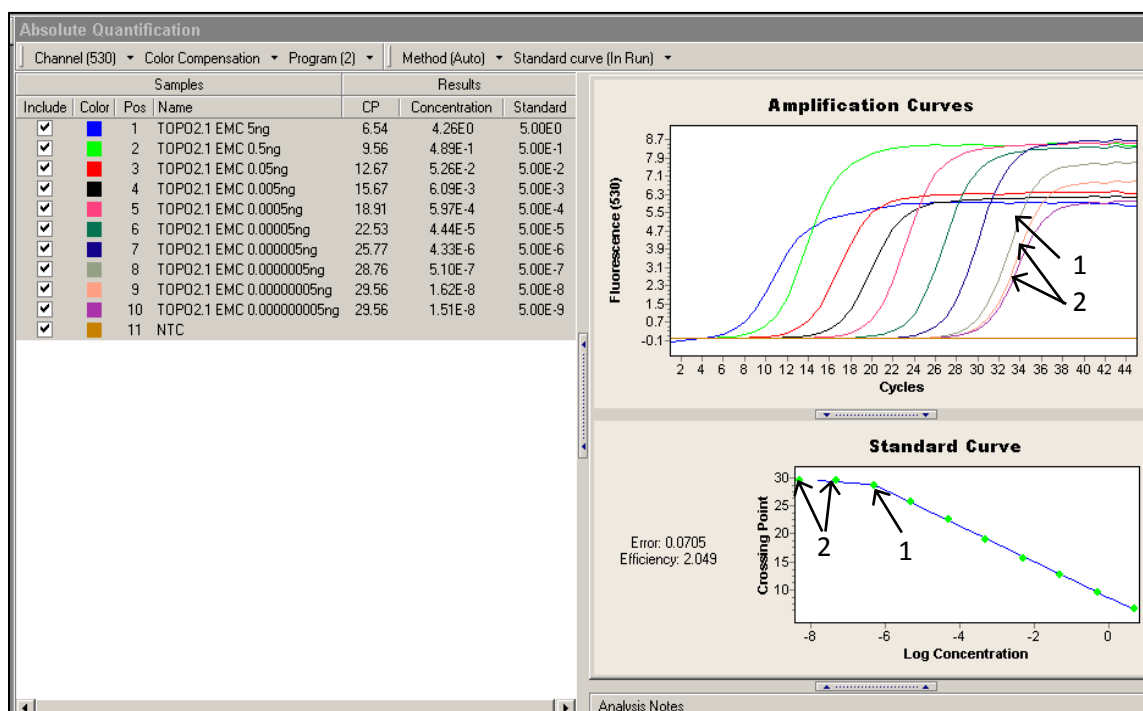


Figura 27. Límite inferior de detección para la qPCR del EMCV. 1) Límite inferior de cuantificación corresponde a la concentración del estándar 8 con una concentración de 500 ag (5×10^{-16} g) de DNA plasmídico con un C_p de 28.76; 2) Se puede observar que el punto 9 y 10 deben ser descartados de la curva estándar, ya que no se desdoblaron a la concentración esperada de la dilución logarítmica (1:10), lo que impide una correcta interpolación de los datos durante la cuantificación absoluta de las partículas virales del EMCV. Sin embargo, permiten el establecimiento del límite inferior de detección a una concentración de 15.1 ag (5×10^{-17} g).

7.3 Elaboración de la curva estándar para la cuantificación absoluta por qPCR del EMCV.

Con el rango dinámico preestablecido, se procedió a realizar la curva estándar comenzando por la cuantificación por absorbancia de la dilución inicial o *stock* de DNA plasmídico utilizando el *Nanodrop 1000 Spectrophotometer*® de Thermo Scientific (Figura 28), la cual se llevó a una concentración de 25 ng/ μ L, a partir de la cual se realizaron todas las diluciones seriales a un volumen final de 50 μ L usando agua ultrapura.

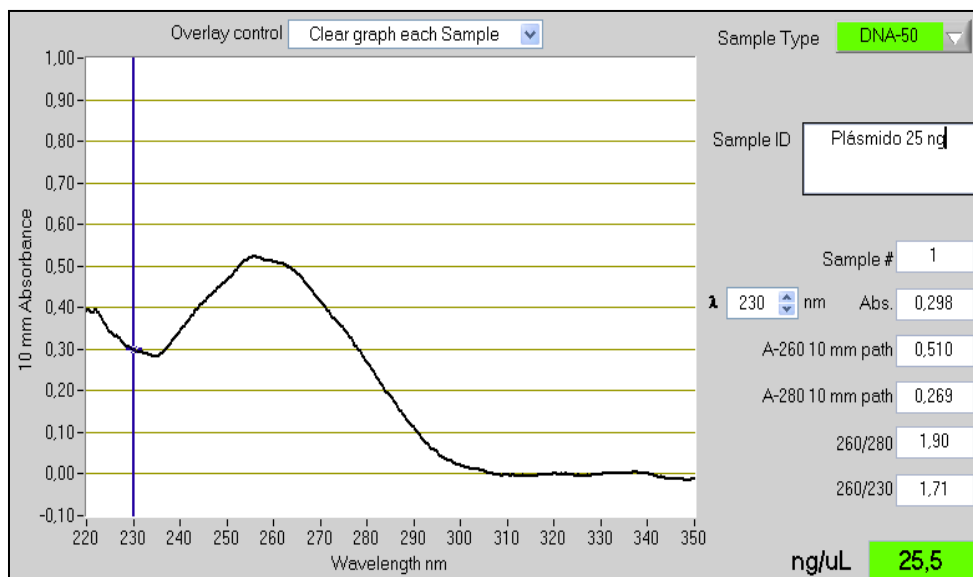


Figura 28. Cuantificación por espectrofotometría de la dilución inicial del DNA plasmídico. Mostrando una adecuada dilución del DNA plasmídico a una concentración de 25 ng/μL, con una adecuada pureza (A_{260}/A_{280} de 1.90) para ser utilizado para el establecimiento de la curva estándar.

Para el establecimiento de la equivalencia de número de copias del EMCV presentes en la curva estándar, se realizó la conversión de gramos de DNA a número de copias/genomas del EMCV utilizando la siguiente fórmula (Tevfik, 2006):

$$N = \text{Plásmido} + \text{Amplicon} = 3931 \text{ pb} + 185 \text{ pb} = 4116 \text{ pb}$$

$$pmol = [\text{concentración}] \times (1 \times 10^6) \times \left(\frac{1 \text{ pmol}}{660} \right) \times \left(\frac{1}{N} \right)$$

$$pmol = [0.025 \mu\text{g}] \times (1 \times 10^6) \times \left(\frac{1 \text{ pmol}}{660} \right) \times \left(\frac{1}{4116 \text{ pb}} \right) = 0.009202502$$

$$\text{Genomas / \# copias} = (pmol) \times (1 \times 10^{-12}) \times (6.023 \times 10^{23}) = 5.54 \times 10^9$$

Una vez obtenido el número de copias en 25 ng/μL se procedió a hacer la conversión a número de copias/genomas del resto de las diluciones usadas en el establecimiento del rango dinámico de cuantificación y del rango dinámico de detección (Tabla 7).

Tabla 7. Conversión de concentración del DNA plasmídico a copias/genomas del EMCV.

Diluciones		Concentración utilizada en la curva estándar	
Concentración	Copias/Genomas	Concentración	Copias/Genomas
25 ng/μL	5.54×10^9	50 ng/μL*	1.1×10^{10}
2.5 ng/μL	5.54×10^8	5 ng/μL	1.1×10^9
0.25 ng/μL	5.54×10^7	0.5 ng/μL	1.1×10^8
0.025 ng/μL	5.54×10^6	0.05 ng/μL	1.1×10^7
0.0025 ng/μL	5.54×10^5	0.005 ng/μL	1.1×10^6
0.00025 ng/μL	5.54×10^4	0.0005 ng/μL	1.1×10^5
0.000025 ng/μL	5.54×10^3	0.00005 ng/μL	1.1×10^4
0.0000025 ng/μL	5.54×10^2	0.000005 ng/μL	1.1×10^3 (1110 copias)
0.00000025 ng/μL	5.54×10^1	0.0000005 ng/μL	1.1×10^2 (110 copias)
0.000000025 ng/μL	5.54×10^0	0.00000005 ng/μL	1.1×10^1 (11 copias)
0.0000000025 ng/μL	5.54×10^{-1}	0.000000005 ng/μL	1.1×10^0 (1 copias)

* Concentración calculada pero no utilizada dentro de la curva estándar, puesto que es está fuera del rango de detección del instrumento.

Una vez realizada la conversión de la concentración del DNA plasmídico a número de copias del EMCV, se estableció que el rango dinámico de detección (5 ng a 15.1 ag) equivaldría a detectar de 1×10^9 a 3.32 copia(s)/genoma(s) del EMCV, mientras que el rango dinámico de cuantificación (5 ng a 500 ag) equivaldría a la detección de 1.1×10^9 a 110 copias/genomas.

Con base en estos resultados se realizó la curva estándar que incluye las concentraciones del rango dinámico de cuantificación, lo que permite obtener una muy exacta cuantificación absoluta de las partículas virales del EMCV por medio de qPCR (Figura 29).

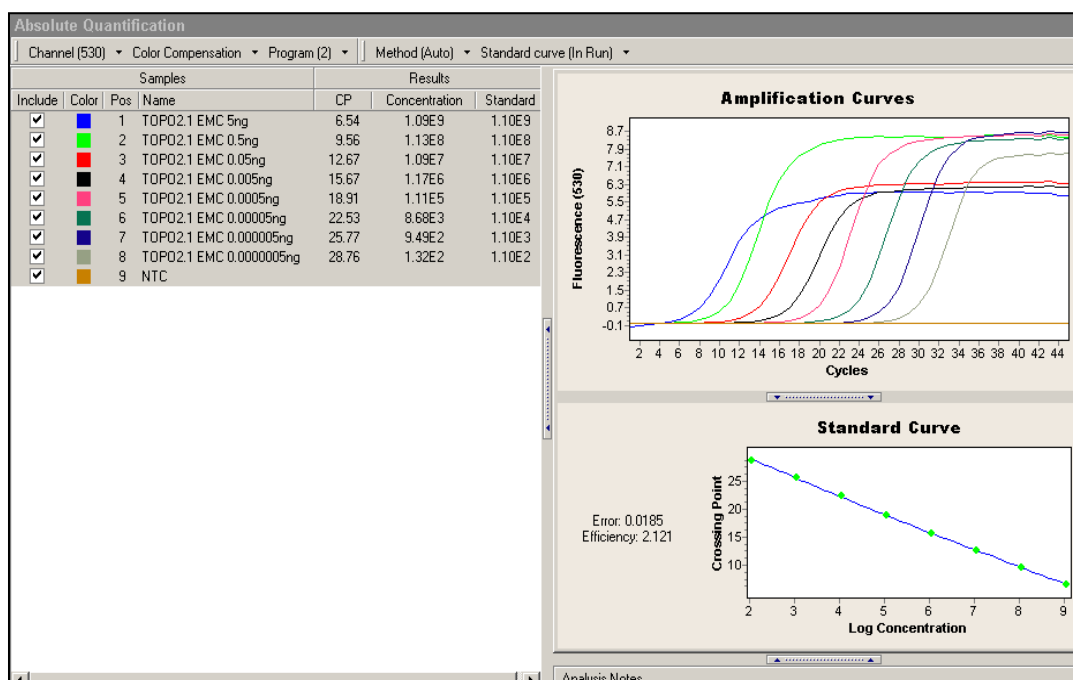


Figura 29. Curva estándar para la cuantificación absoluta de partículas del EMCV por qPCR, se observa un correcto desdoblamiento de las diluciones para la curva estándar del EMCV abarcando la detección del C_p de las muestras de 6.54-28.76; así mismo, se obtuvo una eficiencia de 2.121, valor que permite asegurar que hubo una duplicación del producto en cada ciclo de amplificación.

Con el fin de determinar qué tan óptimo es el ensayo, se utilizó el programa de *Microsoft Office Excel*® 2007, en el cual se realizó un gráfico de dispersión a partir de los valores de C_p y el logaritmo de la concentración de los puntos de la curva estándar y se calculó la línea de tendencia (regresión lineal) que mejor se ajusta a los puntos de la curva, mediante el método de mínimos cuadrados (Figura 30), obteniendo los siguientes valores en la ecuación de la línea recta generada:

$$y = mx + b$$

$$y = -3.1317x + 31.453$$

Donde $y = C_p$, m =pendiente, x representa el \log_{10} de la DNA molde y b = intersección en y

Un ensayo perfecto presenta una pendiente de -3.32, que correspondería a una eficiencia del 100%, por lo que el valor obtenido de la pendiente es aceptable. Así mismo, se estableció el coeficiente de determinación o de correlación de Pearson " R^2 ", el cual es un estadístico muestral que permite determinar la calidad del modelo mediante el ajuste de los datos a la línea teórica de regresión lineal, lo que se traduce en la precisión de las diluciones y del pipeteo, que permitirían la replicación de los resultados entre ensayos, usando las mismas condiciones de amplificación. El valor de R^2 fue de 0.996 que se traduce en que la variación del 99.6% de los datos se ajustan a la línea de tendencia obtenida (Figura 30).

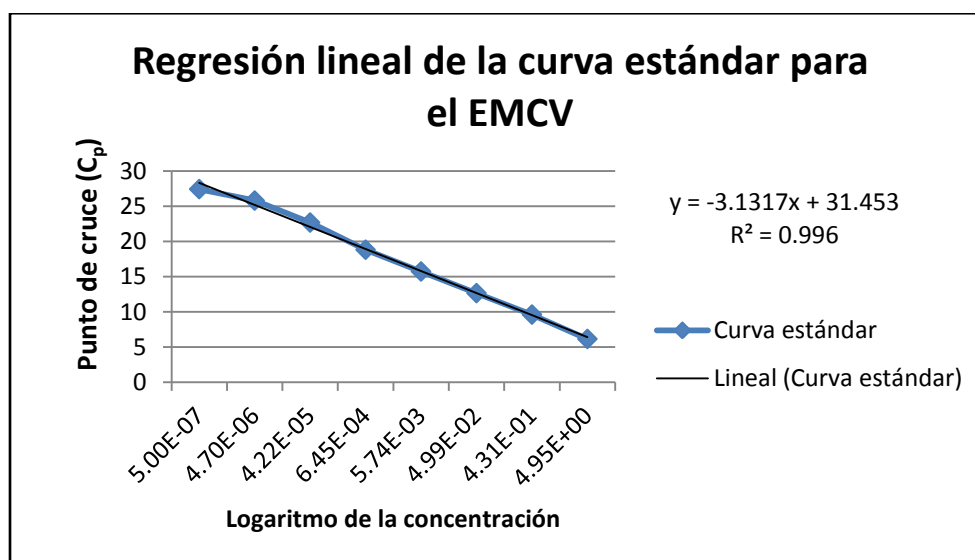


Figura 30. Parámetros de la regresión lineal de la curva estándar para el EMCV. El gráfico muestra la ecuación correspondiente a la estimación lineal y el coeficiente de correlación R^2 que al ser de 0.996 le confiere precisión a la curva estándar ya que se traduce a que el 99.6% de los datos se ajustan a la misma permitiendo una buena cuantificación de las muestras.

Por último, se realizó el análisis de las curvas de fusión, con la finalidad de comprobar la especificidad de los oligonucleótidos hacia las secuencias flanqueadoras del producto deseado (185 pb), obteniendo un sólo pico de fusión correspondiente al amplicón del EMCV, confirmando el correcto diseño de los oligonucleótidos y su elevada especificidad (Figura 31).

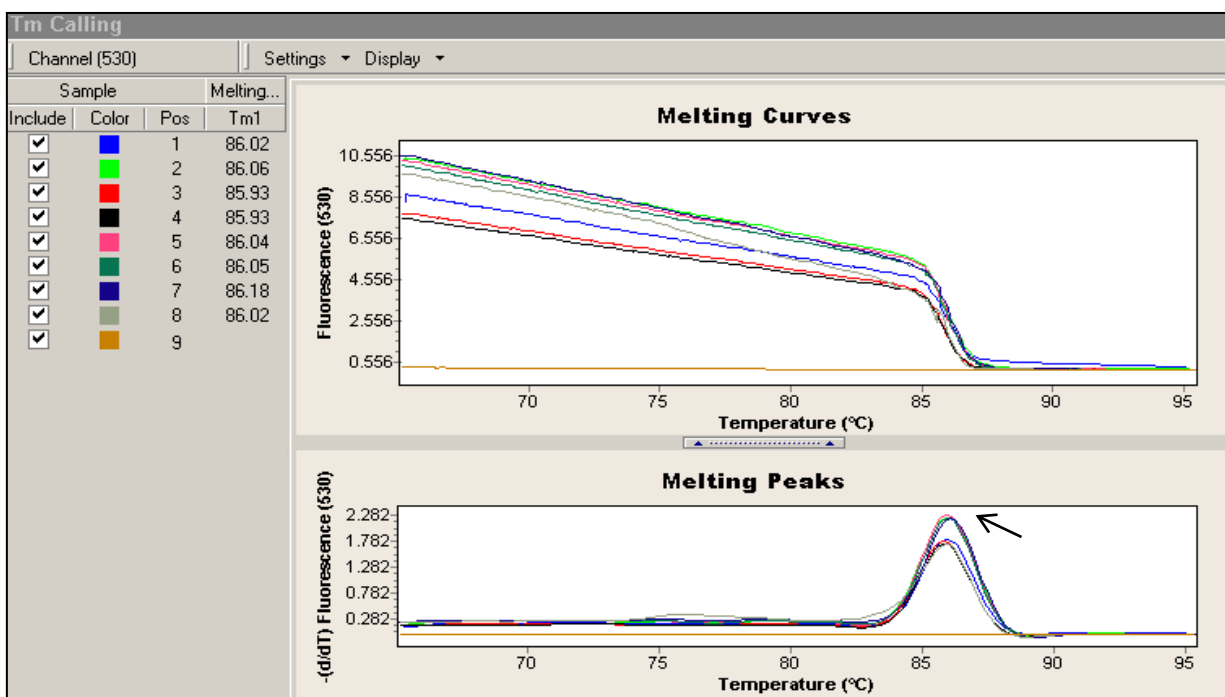


Figura 31. Análisis de las curvas de fusión. Se muestra con una flecha negra un solo pico correspondiente a un sólo producto de amplificación que se forma a aproximadamente 86 °C, confirmando la especificidad y la adecuada concentración de los oligonucleótidos.

7.4 Cuantificación absoluta del EMCV por qPCR

Para la cuantificación absoluta del virus EMCV se realizó una qPCR en la cual se incluyó la curva estándar establecida previamente con un rango de detección de 1.1×10^9 a 1.1×10^2 partículas virales, así como las cuatro diluciones del virus EMCV realizadas previamente.

Una vez finalizada, se interpolaron los valores de los C_p de las muestras a la regresión lineal de la curva estándar, para conocer el número de partículas virales del EMCV que contenía cada muestra (Figura 32).

Con los valores obtenidos se realizó una tabla comparativa entre el título viral obtenido por la prueba de $TCID_{50}$ y la cuantificación absoluta por qPCR de las partículas virales del EMCV (Tabla 8).

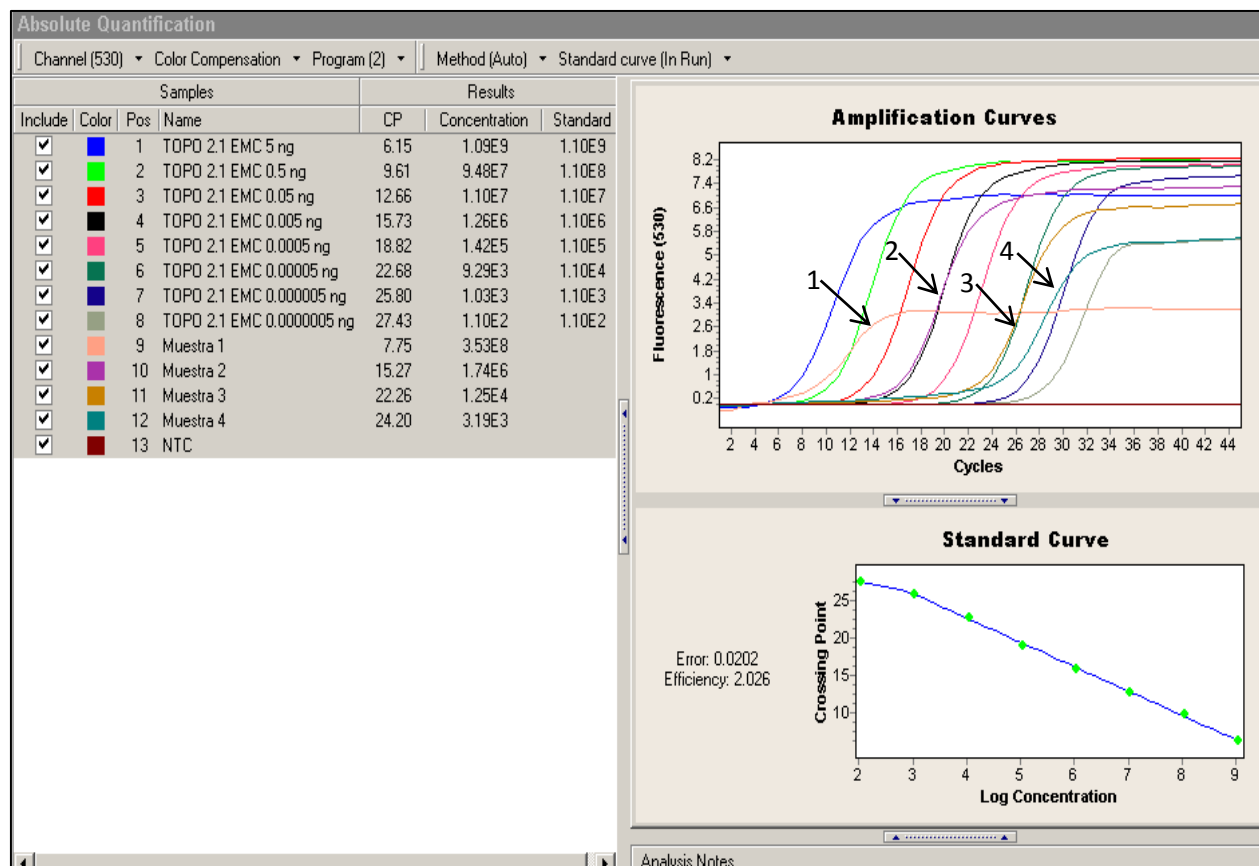


Figura 32. Cuantificación absoluta de partículas virales del EMCV por qPCR. La figura señala las 4 muestras que se cuantificaron. 1) Muestra 1 (1×10^7 partículas infecciosas), 2) Muestra 2 (1×10^5 partículas infecciosas), 3) Muestra 3 (1×10^3 partículas infecciosas) y 4) Muestra 4 (1×10^2 partículas infecciosas), las cuales una vez obtenido su valor de C_p , fueron interpoladas a la curva estándar, para estimar el número de copias/genomas del virus.

Tabla 8. Resultados de la qPCR para la cuantificación absoluta de las partículas virales del EMCV.

Analito	Concentración calculada	Concentración obtenida	Número de copias/genomas calculadas	Número de copias/genomas obtenidas
Curva estándar	5×10^{-9} g (5ng)	4.95×10^{-9} g	1.1×10^9	9.38×10^8
	5×10^{-10} g (0.5ng)	4.31×10^{-10} g	1.1×10^8	1.08×10^8
	5×10^{-11} g (50 pg)	4.99×10^{-11} g	1.1×10^7	1.16×10^7
	5×10^{-12} g (5 pg)	5.75×10^{-12} g	1.1×10^6	1.34×10^6
	5×10^{-13} g (0.5 fg)	6.45×10^{-13} g	1.1×10^5	1.31×10^5
	5×10^{-14} g (50 fg)	4.22×10^{-14} g	1.1×10^4	9.77×10^3
	5×10^{-15} g (5 fg)	4.70×10^{-15} g	1.1×10^3	9.53×10^2
	5×10^{-16} g (500 ag)	4.31×10^{-16} g	1.1×10^2	1.12×10^2
Muestra 1	---	1.61×10^{-9} g	1×10^7 *	3.53×10^8
Muestra 2	---	7.91×10^{-12} g	1×10^5 *	1.74×10^6
Muestra 3	---	5.69×10^{-14} g	1×10^3 *	3.53×10^4
Muestra 4	---	1.45×10^{-14} g	1×10^2 *	3.19×10^3

--- Concentración muy pequeña para ser cuantificada por espectrofotometría.

* Partículas virales infecciosas.

Con base en los datos obtenidos en la qPCR (Tabla 8) se logra observar que por esta técnica es posible detectar y cuantificar un logaritmo más de partículas virales del EMCV en comparación con la prueba TCID₅₀, lo que permite tener mayor sensibilidad al permitir la cuantificación tanto de partículas infecciosas como de no infecciosas.

Por último, los productos de qPCR fueron corridos en un gel de agarosa al 1%, para observar el cambio de concentración entre los puntos de la curva estándar y las muestras utilizadas para realizar la cuantificación absoluta de partículas del EMCV (Figura 33).

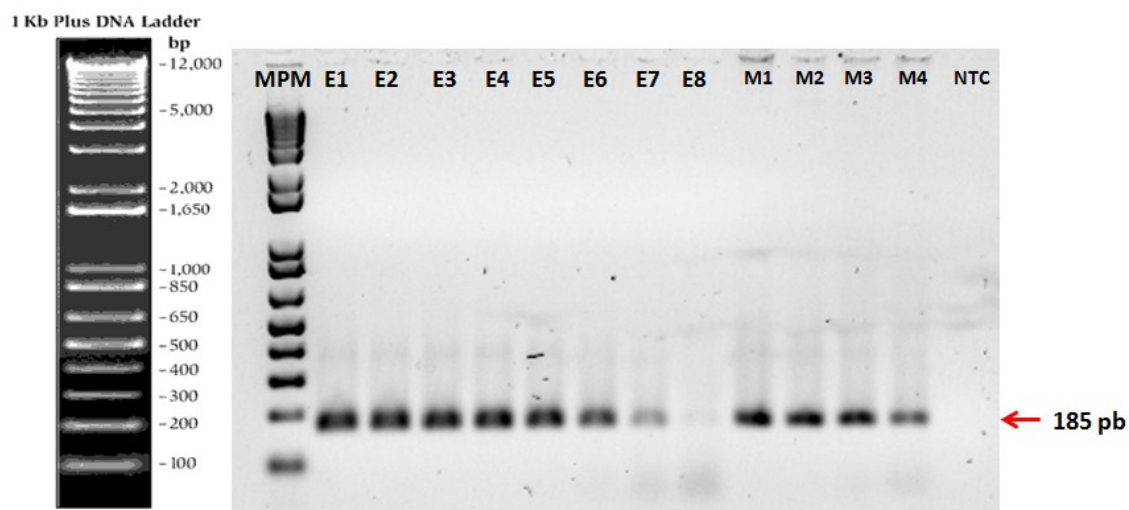


Figura 33. Electroforesis de los productos de la qPCR. Mostrando los puntos de la curva estándar para el EMCV (E1-E8) y las muestras utilizadas para retar la curva (M1-M4), donde se observa un rango de detección más limitado ya que el estándar 8 o “E8” con una concentración de 500 ag (110 copias/genomas) se muestra como un falso negativo, comparado con el análisis de cuantificación absoluta por qPCR.

VIII. DISCUSIÓN

En los programas de evaluación de la seguridad viral es necesario utilizar pruebas de detección y cuantificación de virus que proporcionen un alto grado de confianza de que tanto el proceso de manufacturación como el producto final están libres de contaminantes virales. Estas pruebas tienen como objetivo evaluar y aprobar la utilización de sistemas celulares, materiales de partida, descartar la presencia de virus adventicios y demostrar que cada etapa del proceso es adecuada para efectuar su propósito de inactivar y/o remover contaminantes virales. En la actualidad la industria enfrenta el reto de implementar y estandarizar estrategias para mejorar la seguridad de los productos biotecnológicos (Baylis y Blümel, 2010).

Los estudios más utilizados son los basados en infectividad, sin embargo presentan ciertas limitantes en su desarrollo experimental, además de presentar un limitado alcance al estar restringidos a la evaluación de agentes infecciosos capaces de mostrar un efecto citopático *in vitro*, pudiendo ser sólo aplicadas en la evaluación de etapas del proceso que tienen efecto en la reducción del potencial infeccioso de los virus (Rosenberg *et al.*, 2011). Es por eso que en este trabajo se propuso la estandarización de una qPCR para la cuantificación absoluta de las partículas del virus modelo no específico el EMCV, utilizando como agente de detección el SYBR Green, que ha sido aplicado con éxito en la cuantificación de varios virus que infectan células animales (Martínez *et al.*, 2008; Ramesh *et al.*, 2014). La finalidad de este trabajo fue estandarizar una técnica de qPCR que pueda ser trasladada a la evaluación de etapas de un proceso de manufactura de producción de productos biotecnológicos como es el caso de proteínas recombinantes, anticuerpos monoclonales, ácidos nucleicos sintéticos etc. (BioReliance, 2014).

En este trabajo, la qPCR demuestra ser un método analítico que produce resultados consistentes en condiciones estándar de funcionamiento (p. ej. en el procesamiento de muestras derivadas de un producto biotecnológico) permitiendo la detección de un logaritmo más de partículas en comparación con las pruebas de infectividad. Además, de cumplir con los parámetros necesarios para un buen ensayo de valoración al presentar gran especificidad hacia el EMCV, demostrada mediante el análisis de las curvas de fusión (T_m), donde se obtuvo un solo pico a una temperatura de ~ 86 °C, este resultado es debido en gran medida a la selección y diseño apropiado de oligonucleótidos que carecen de reactividad cruzada, utilizando secuencias altamente conservadas, con capacidad de detectar la mayor cantidad de variantes y cepas posibles (Baylis y Blümel, 2010; Lovatt, 2002).

Así mismo, cumple con el requisito del establecimiento de los límites de detección y cuantificación, que sustentan la elevada sensibilidad de la prueba desarrollada, y muestra un gran rango de detección de 5 ng (5×10^{-9} g) hasta 15.1 ag (15.1×10^{-17} g), que equivale a detectar desde 1.1×10^9 hasta 30 copias/genomas del EMCV, así como la cuantificación con gran exactitud de un amplio rango dinámico de 1.1×10^9 a 110 copias/genomas del EMCV, detectándose una relación lineal entre el DNA plasmídico y los valores de C_p obtenidos a lo largo del rango de cuantificación utilizando SYBR Green como reportero. Esta sensibilidad es comparable a la obtenida en trabajos como los de Ramesh *et al.* (2014) donde se trabajó un rango de detección de 10^1 - 10^5 copias/genomas del (MBV) mediante el uso de DNA plasmídico para la elaboración de la curva estándar. Por lo que es posible afirmar que el presente ensayo satisface relativamente el problema de la detección de contaminantes virales a muy bajas concentraciones (Dodet *et al.*, 2010).

En cuando a la evaluación de la reproducibilidad del ensayo, se calculó el coeficiente de determinación (R^2), la pendiente de la recta obtenida a partir de la regresión lineal de la curva estándar y la intercepción-y (Lovatt, 2002). Se obtuvieron valores apropiados al contrastarse con los valores de una qPCR perfecta, delimitados por Tevfik (2006), ya que un coeficiente de determinación " R^2 " de 0.996, cuando el que el mínimo valor aceptado es de 0.90. Así mismo, se obtuvo una pendiente de -3.13, cuando una pendiente ideal es de -3.32 y una y-intercepción de 31.45, este último ligeramente debajo del rango ideal de 33, lo que podría mejorarse al reducir el periodo de utilización del DNA plasmídico que pudiera provocar su degradación. Así mismo, la eficiencia de 2.12 nos permite aseverar que hubo una duplicación de los productos en cada ciclo de reacción, con una ligera sobrestimación, que puede ser en futuros trabajos corregida al utilizar plásmidos previamente linealizado.

En los resultados, se observó que la qPCR presenta un rango más amplio de detección que la PCR convencional y que es posible cuantificar un logaritmo más con la qPCR, en comparación con el valor obtenido del título viral, al permitir tanto la cuantificación de las partículas virales infecciosas como de no infecciosas. Por último, al comparar el tiempo de procesamiento de esta prueba con aquellas basadas en infectividad, se observó que la qPCR tiene una mayor cantidad de procesamiento en menor tiempo ya que es posible realizar la evaluación en dos días mientras que las pruebas de infectividad requieren mínimo una semana para efectuarse, lo que le permite ser implementada en el análisis de diferentes etapas del proceso que tengan como objetivo previsto la remoción de partículas virales, como es el caso de etapas de filtración (por ej. nanofiltración y fraccionamiento por cromatografía) y así calcular el factor de remoción de las mismas (Rosenberg *et al.*, 2011). Así mismo, cuenta con la ventaja de que pueden realizarse múltiples replicas de las reacciones para aumentar la probabilidad de observar niveles bajos de virus que se encuentran por debajo del límite de cuantificación y minimizar el error humano (Dodet *et al.*, 2010).

En resumen la qPCR proporciona una mejora a la evaluación de los procesos de manufacturación de productos biotecnológicos de los cuales depende la comercialización del producto, ya que la amplia gama de información que genera el ensayo podría permitir una retroalimentación oportuna del estado del proceso, que contrastada con los resultados de pruebas basadas en infectividad (ej. TCID₅₀), lograrían la obtención de una valoración más robusta del funcionamiento de las etapas de producción (tanto las propensas a contaminación como las encargadas de eliminar contaminantes virales) y de las decisiones y acciones a tomar respecto a la seguridad de los productos biotecnológicos, lo que puede ser traducido en acciones correctivas o en la adición de etapas al proceso en caso de que sea necesario.

IX. CONCLUSIONES

La cuantificación absoluta por medio de la técnica de PCR en tiempo real (qPCR) permite identificar y cuantificar partículas virales infecciosas y no infecciosas del virus de la Encefalomiocarditis (EMCV), pudiendo ser utilizada en la evaluación de diversas etapas del proceso para proporcionar información valiosa sobre el estado de la seguridad viral en productos biotecnológicos.

Por lo anterior la qPCR puede ser utilizada como una técnica de evaluación de la remoción viral que contraste los resultados basados en infectividad, favoreciendo un análisis robusto y adecuado que valide los procesos de producción de medicamentos biotecnológicos en menor cantidad de tiempo.

X. REFERENCIAS

- Aranha, H., 2012. Current Issues in Assuring Virological Safety of Biopharmaceuticals. *BioProcess International*, 10(3): 12-16.
- ATCC, 2013. *Encephalomyocarditis virus (ATCC® VR-1479™)*. [En línea] Disponible en: www.atcc.org [Último acceso: 10 Diciembre 2013].
- Barakat, N. S., 2012. Biological Products: Manufacturing, Handling, Packaging and Storage, Promising Pharmaceuticals, *Intechopen*. King Saud University, Saudi Arabia, 63-81.
- Baylis, S. A., Blümel, J., 2010. Regulatory Expectations of Validation/Qualification of Adventitious Virus Assays. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 64(5): 486-491.
- BioReliance, 2014. *A guide to planning your Viral or TSE Clearance Study*. pp.2-20 [En línea] Disponible en: <http://www.bioreliance.com> [Último acceso: 25 Abril 2014].
- Bustin, S., Benes, V., Nolan, T. & Pfaffl, M., 2005. Quantitative real-time RT-PCR- a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*, 34: 597-601.
- Bustin, S., Benes, V., Nolan, T., Pfaffl, M., 2005. Review: Quantitative real-time RT-PCR- a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*, 34: 597-601.
- Canelli, E., Luppi, A., Lavazza, A., Lelli, D., Sozzi, E., Martin, A., Gelmetti, D., 2010. Encephalomyocarditis virus infection in an Italian zoo. *Virology Journal*, 64(7): 1-7.
- Carocci, M., Bakkali-Kassimi, L., 2012. The encephalomyocarditis virus. *Virulence*, 3(4): 351-367.
- Costa, J., 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(5): 299-305.
- Dieffenbach, C., Lowe, T. M., Dveksler, G., 1993. General concepts for PCR primer design. *Genome Research*, 3: 30-36.
- Dodet, B., Hesselink, W., Jungbäck, C., Léchenet, J., Pastoret, P., Vannier, P., Vicari, M., 2010. Viral safety and extraneous agents testing for veterinary vaccines. *Biologicals*, 38: 326-331.
- Elsalam, K., 2003. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *African Journal of Biotechnology*, 2(5): 91-95.
- EMA, 2008. Guideline on virus safety evaluation of biotechnological Investigational Medicinal Products. *European Medicines Agency*. pp.1-9. [En línea] Disponible en: <http://www.ema.europa.eu> [Último acceso: 2014 Abril 30]
- Farshid, M., Taffs, R., Scott, D., Asher, D., Brorson, K., 2005. The clearance of viruses and transmissible spongiform encephalopathy agents from biologicals. *Science Direct*, 16: 561-567.
- FDA, 1997. *Guidance for Industry S6 Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals*. pp.1-15 [En línea] Disponible en: <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm> [Último acceso: 20 Julio 2013].

- FDA, 1998. QA5 Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived From Cell Lines of Human or Animal Origin. *Food and Drug Administration*. pp.1-33 [En línea] Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm073454.pdf> [Último acceso: 2013 Diciembre 10]
- FDA, 2014. Licensed Biological Products with Supporting Documents. *Food and Drug Administration*. [En línea] Disponible en: <http://www.fda.gov/biologicsbloodvaccines/ucm133705.htm> [Último acceso: Abril 2014 25].
- Fermentas, 2006, GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit, *Fermentas Life Science*. pp.1-4 [En línea] Disponible en: www.fermentas.com [Último acceso: 2013 Octubre 5].
- FEUM, 2011. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 10.^a ed., *Sectetaria de Salud*. México
- Flint, S., Racaniello, V., Enquist, L., Skalka, A., 2009. *Principles of Virology, Vol. 1 Molecular Biology*. 3.^a ed. ASM Press, Washington, DC, 3-25.
- Garibyan, L., Avashia, N., 2013. Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 133: 1-4.
- Henzler, H.-J., Kaiser, K., 1988. Avoiding viral contamination in biotechnological and pharmaceutical processes. *Nature America*, 16: 1077-1079.
- Herrero Uribe, L., 2011. Viruses, definitions and reality. *Rev. Biol. Trop.*, 59(3): 993-998.
- ICH, 1999. Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin Q5A(R1). *International Conference on Harmonisation (ICH)*, 5-31.
- Krämer, I., Sauer, T., 2010. *The New World of Biosimilars: Whar Diabetologists Need to Know about Biosimilar Insulins*. pp.1-6 [En línea] Disponible en: http://www.medscape.com/viewarticle/726747_2 [Último acceso: 18 Abril 2014].
- LightCycler, 2011. Manual de usuario: LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I, *Roche*, Versión 17, 1-24.
- Liu, H., Yan, Q., Zhao, B., Luo, J., Wang, C., Du, Y., Yan, J., He, H., 2013. Isolation, molecular characterization, and phylogenetic analysis of encephalomyocarditis virus from South China Tigers. *Infection, Genetics and Evolution*, 19: 240-243.
- Lovatt, A., 2002. Applications of quantitative PCR in the biosafety and genetic stability assessment of biotechnology products. *Molecular Biotechnology*, 82: 279-300.
- Martínez, E., Riera, P., Sitjà, M., Fang, Y., Oliveira, S., Maldonado, J., 2008. Simultaneous detection and genotyping of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) by real-time RT-PCR and amplicon melting curve analysis using SYBR Green. *ScienceDirect*, 85: 184-193.
- Millipore, 2002. Ensuring Compliance: Regulatory Guidance for Virus Clearance Validation. *Millipore*. pp.1-8 [En línea] Disponible en: <http://www.merckmillipore.com> [Último acceso: 2014 Febrero 15].
- Nolan, T., Hands, R. E., Bustin, S. A., 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *NATURE PROTOCOLS*, 1(3):1559-1582.

- Oberste, M., Gotuzzo, E., Blair, P., Nix, W., Ksiazek, G., Comer, J., 2009. Human Febrile Illness Caused by Encephalomyocarditis Virus Infection, Perú. *Emerging Infectious Diseases*, 15(4): 640-646.
- Offit, P. A., 2006. The cutter Incident: How America's First Polio Vaccine Led to a a Growing Vaccine Crisis. *Journal of the Royal Society of Medicine*, Marzo, 99: 156 y 157.
- QIAGEN®, 2007. *QIAamp® Viral RNA Mini Handbook*. 3.ª ed. *Sample & Assay Technologies*. USA, 4-44.
- Rahman, M., Uddin, M., Sultana, R., Moue, A., Setu, M., 2013. Polymerase Chain Reaction (PCR): A short Review. *Anwer Khan Modern Medical College (AKMMC)*, 4(1): 30-36.
- Ramesh, D., Sanjunctha, M., Rajan, J., Bharathi, A., Santiago, T., Alavandi, S., Poormina, M., 2014. Development of SYBR Green based real time PCR assay for detection on monodon baculovirus in *Penaeus monodon*. *Journal of Virological Methods*, 205: 81-86.
- Rosenberg, A., Cherney, B., Brorson, K., Clouse, K., Kozlowski, S., Hughes, P., Friedman, R., 2011. Risk Mitigation Strategies for Viral Contamination of Biotechnology Products: Consideration of Best Practices. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 65(6): 563-568.
- Sambrook, J., Russell, D. W., 1989. *Molecular cloning a Laboratory Manual*. 2.ª ed. *Cold Spring Harbor Laboratory press*, USA.
- Secretaria de Salud, d. I. E. U. M., 2012. *NORMA Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-001-SSA1-2012*. [En línea] Disponible en: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5269530 [Último acceso: 2014 Marzo 3].
- Suvarna, K., Lolas, A., Hughes, P., Friedman, R. L., 2011. Case Studies of Microbial Contamination in Biologic Product Manufacturing. *Microbiology*, USA, Illinois, 50-56.
- Tevfik Dorak, M., 2006. Real-time PCR. *Taylor & Francis Group*. 1.ª ed., Newcastle University, United Kingdom, 1-143.
- Talbot, J., Waller, P., 2004, Stephens' Detection of New Adverse Drug Reactions, Wiley, 5.ª ed., England, 559-568.
- TOPO® TA Cloning®, 2012, Manual de usuario: Kit TOPO® TA Cloning® de Invitrogen, 1.ª ed. *Life technologies™*, USA, 1-36
- Wallace, R., Shaffer, J., Murphy, R., Bonner, J., Hirose, T., Itakura, K., 1979. Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Res*, 6: 3543-3557.
- Yeo, D., Liar, J., Fernandez, C., Lin, Y., Liaw, C., Soh, M., Lim, E., Chan, K., Ng, M., Tan, H., Oh, S., Ooi, E., Tan, B., 2013. A highly divergent Encephalomyocarditis virus isolated from nonhuman primates in Singapore. *Virology Journal*, 10(1): 248-250.
- Yokoyama, T., Murozuka, T., Wakisaka, A., Tanifuji, M., Tomono, T., 2004. Removal of small non-enveloped viruses by nanofiltration. *VoxSanguinis*, 86: 225-229.

XI. GLOSARIO

Agentes adventicios: son aquellos virus, partículas virales, priones o microbios (incluyendo bacterias, hongos, micoplasma-espiroplasma, micobacterias, rickettsia, protozoarios, parásitos, agentes de la encefalopatía espongiforme transmisible u otras formas moleculares) contaminantes de un cultivo celular y de los materiales de partida de un proceso biotecnológico, que se introducen de manera no intencional dentro del proceso de fabricación y que potencialmente pueden contaminar células procarióticas o eucarióticas usadas en la producción.

Amplicón: Secuencia de DNA amplificada durante el proceso de PCR.

Banco Celular Maestro (BCM): Células resguardadas que generalmente se han producido a partir de células seleccionadas en condiciones definidas, dispensadas en múltiples contenedores, almacenadas en condiciones definidas para ser utilizadas en la producción de biofármacos con una identidad, estabilidad y uniformidad caracterizadas.

Biofármaco: Sustancia que ha sido producida por biotecnología molecular, que tenga actividad farmacológica, que se identifique por sus propiedades físicas, químicas y biológicas, que reúna condiciones para ser empleada como principio activo de un medicamento o ingrediente de un medicamento.

Biomedicamento: Sustancia producida por biotecnología molecular que tenga efecto terapéutico, preventivo o de rehabilitación, que se presenta en forma farmacéutica, se identifique como tal por su actividad farmacológica y propiedades físicas, químicas y biológicas.

Buenas Prácticas de Fabricación (BPF): conjunto de lineamientos y actividades relacionadas entre sí, destinadas a asegurar que los productos farmacéuticos elaborados tengan y mantengan la identidad, pureza, concentración, potencia e inocuidad, requeridas para su uso.

Caracterización del proceso de remoción viral: estudios de remoción viral en el que se utilizan virus modelo no específicos para evaluar la robustez del proceso de fabricación para eliminar y/o inactivar los virus.

Cápside: Capa exterior de proteínas virales que rodea el genoma en una partícula viral.

Célula susceptible y permisible: Susceptible se refiere a que la célula expresa el receptor requerido para la entrada del virus, mientras que permisible se refiere a la capacidad de soportar la replicación del virus cuando se introduce el ácido nucleico viral.

Clonación de un gen: Inserción de una secuencia de DNA en un vector que puede ser amplificado en un organismo o célula hospedera, generando un número alto de copias de la secuencia.

Contaminante: impurezas indeseables de naturaleza química o microbiológica, o de materia extraña, introducidas a una materia prima, intermedio o fármaco durante la producción, muestreo, empaque, almacenamiento o transporte.

Control de calidad: sistema de actividades operacionales rutinarias puestas en el lugar donde se desarrollan los procesos para identificar y corregir las desviaciones de los requisitos establecidos.

Crossing point "C_p" (Punto de cruce): Refleja el ciclo en el cual la fluorescencia generada en la reacción cruza el umbral de detección o que se han acumulado un número suficiente de amplicones.

Cuantificación absoluta: Ensayo utilizado para cuantificar muestras desconocidas, interpolando su cantidad a una curva estándar (ej. en la determinación del número de copias virales).

Curva estándar: Se obtiene mediante valores de C_p contra las concentraciones logarítmicas de las diluciones en serie del ácido nucleico molde. Se obtiene para la PCR cuantitativa, donde la gama de concentraciones debe cubrir el rango de concentraciones de las muestras desconocidas.

Curvas de fusión (disociación): Cada fragmento de DNA tiene un punto de fusión (T_m) en el que el 50% del DNA es de cadena sencilla. La temperatura depende de la longitud de DNA, así como de su contenido de G:C. cuando se utilizan tintes de unión al DNA, el fragmento se calienta y hay una disminución de la fluorescencia hasta que se alcanza la T_m (debido a la disociación de las hebras de DNA y la liberación del colorante). Este punto determina el punto de la curva de fusión.

Dilución logarítmica (log-dilución): Diluciones seriales en series de potencias de 10 (10, 100, 1000, etc.).

Eficiencia de reacción: Se calcula con la siguiente ecuación: $E=10^{(-1/pendiente)} -1$. Esta debe estar entre 90-100%, lo cual significa que el amplicón se duplica en cada ciclo. Corresponde a una pendiente de 3.1 a 3.6 en el C_p vs el log de la cantidad molde de la curva estándar. Con el fin de obtener resultados reproducibles, las reacciones deben tener una eficiencia lo más cercana posible al 100% (ej. un aumento del doble en cada ciclo) y ser similares tanto para las muestras objetivo como para las de referencia.

Estándar: Muestra de concentración conocida utilizada para construir una curva estándar.

Estudios de evaluación del proceso de remoción viral: estudios eliminación del virus en la que se utilizan virus "modelo" pertinentes y/o específicos para determinar la capacidad del proceso de fabricación de eliminar o inactivar estos virus.

Gene: Secuencia de DNA que codifica para una proteína.

Hospedero: Célula u organismo receptor del vector.

Inactivación viral: Reducción de la infectividad del virus causada por modificación química o física.

Línea de base: Primeros ciclos de PCR en la que hay poco cambio en la señal de fluorescencia (normalmente van en ciclos de 3 a 15).

PCR tiempo real (qPCR): Continua colección de la señal de fluorescencia de la reacción en cadena de la polimerasa a través de los ciclos de reacción.

Parásitos obligados: dependientes de otro organismo vivo para su reproducción.

Partículas similares a virus: Estructuras visibles al microscopio electrónico, que morfológicamente parecen estar relacionados a los virus detectados.

Patógeno: Causantes de enfermedades

Plásmido: Elemento de DNA circular extracromosomal capaz de lograr su replicación autónoma en el interior de células eucariontes o procariontes.

Producto biológico: Cualquier preparación producida o sintetizada a partir de organismos biológicos o sus productos (incluyen las que utilizan biotecnología y otras tecnologías de vanguardia) y usada como agente de diagnóstico, agente preventivo o agente terapéutico. Para su aplicación el producto se puede presentar en diferentes formas farmacéuticas.

Producto biotecnológico: Fármaco, producto farmacéutico o reactivo para diagnóstico en cuyo proceso de producción intervengan organismos vivos o parte de ellos modificados genéticamente.

QA (Aseguramiento de la calidad): Es un sistema involucrado en todos los recursos de una compañía. Abarca políticas y acciones sistemáticas implementadas dentro de un sistema de calidad para cumplir los requisitos y objetivos de producir un producto de la calidad requerida por el cliente o las autoridades, el cual sea seguro.

Rango Dinámico: Rango de concentraciones que sirven como plantilla para obtener el valor preciso de los C_p . En la cuantificación absoluta la interpolación dentro del rango dinámico es exacta, mientras que la extrapolación fuera del rango debe ser evitada. Cuanto mayor sea el rango dinámico, mayor es la capacidad de detectar muestras en la misma prueba con un número de copias tanto alto como bajo.

Recombinante: Que contiene DNA de dos o más orígenes diferentes.

Remoción viral: Separación física o inactivación de virus y partículas virales del producto deseado, mediante su remoción o inactivación de la infectividad viral

TCID₅₀: (del inglés 50% *Tissue Culture Infective Dose*) es una medida para el título viral infeccioso, que consiste en realizar diluciones para cuantificar la cantidad de virus necesarios para matar el 50% de los hospederos o para producir un efecto citopático en el 50% de los cultivos celulares inoculados. Los cultivos celulares se cultivan en placas y posteriormente se le añaden diluciones seriales del virus y se incuban. Después de la incubación, se observa y registra el porcentaje de células infectadas, y los resultados se utilizan para calcular matemáticamente el valor de TCID₅₀. Este método puede tomar hasta una semana debido al tiempo de la infectividad celular

Vector: Plásmido que puede ser usado para transferir una secuencia de DNA de una célula u organismo a otro.

Virión: partícula vírica morfológicamente completa e infecciosa.

Virus: agentes infecciosos (potencialmente patógenos), replicantes intracelulares obligados, que poseen un genoma de ácidos nucleicos (ya sea ácido ribonucleico RNA o ácido desoxirribonucleico DNA), incapaces de crecer y experimentar la fisión binaria. Replicantes según las características de su material genético y la dependencia de la célula infectada.

Virus adventicios: Contaminantes virales introducidos no intencionalmente.

Virus Endógeno: Entidad cuyo genoma viral es parte de la línea germinal de la especie de origen o de la línea celular parental y se integra de forma covalente en el genoma de las líneas celulares que derivan de estas.

Virus no endógenos: Virus presentes en el banco celular debido a fuentes externas.

Virus Modelo no específicos: Virus utilizado en la evaluación de un proceso, cuando el propósito es evaluar la capacidad de este para eliminar y / o inactivar los virus en general, es decir, para caracterizar la solidez y reproducibilidad del proceso de purificación.

Virus relevantes: Virus utilizados en la evaluación de un proceso, los cuales son virus identificados en el proceso o de la misma especie que estos, o que puedan contaminar el sustrato celular o cualquier reactivo o material utilizado en el proceso de producción.

Virus modelos específicos: virus que está estrechamente relacionado con el virus detectado o que se sospecha su presencia (mismo género o familia), que comparten propiedades físicas y químicas similares a las de los virus blanco (detectados o potencialmente presentes).

Zoonosis: se deriva del griego *zoon* (animal) y *nosís* (enfermedad), refiriéndose a cualquier enfermedad infecciosa que puede transmitirse de animales a seres humanos. Generalmente se trata de enfermedades que afectan a los animales vertebrados, incluyendo al hombre.

XII. ANEXOS ACADÉMICOS



XVI CIAM
HOSPITAL CIVIL DE GUADALAJARA

INNOVACIÓN EN SALUD, NUESTRO COMPROMISO



OPD Hospital Civil de Guadalajara, Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias de la Salud

OTORGAN LA PRESENTE

CONSTANCIA

A: Cervantes-Ortiz Sandra, Pedraza-Brindis Eliza, Canales-Aguirre Alejandro, Ortuño-Sahagún Daniel, Márquez-Aguirre Ana Laura.

Por haber participado en el XIII Concurso de Trabajos Libres en Cartel, con el tema:
Estudio de la remoción viral en los procesos de producción de medicamentos biotecnológicos por qPCR
En la categoría: **Investigación Básica**

XVI Congreso Internacional Avances en Medicina Hospital Civil de Guadalajara 2014
“Innovación en salud, nuestro compromiso”

Valor Curricular: 21 horas
Celebrado en Expo Guadalajara del 27 de febrero al 01 de marzo de 2014
Guadalajara, Jal. México



Dr. Héctor Raúl Pérez Gómez
Director General
OPD Hospital Civil de Guadalajara



Dr. Benjamín Becerra Rodríguez
Director
Antiguo Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”



Dr. Francisco Martín Preciado Figueroa
Director
Nuevo Hospital Civil de Guadalajara “Dr. Juan L. Menchaca”



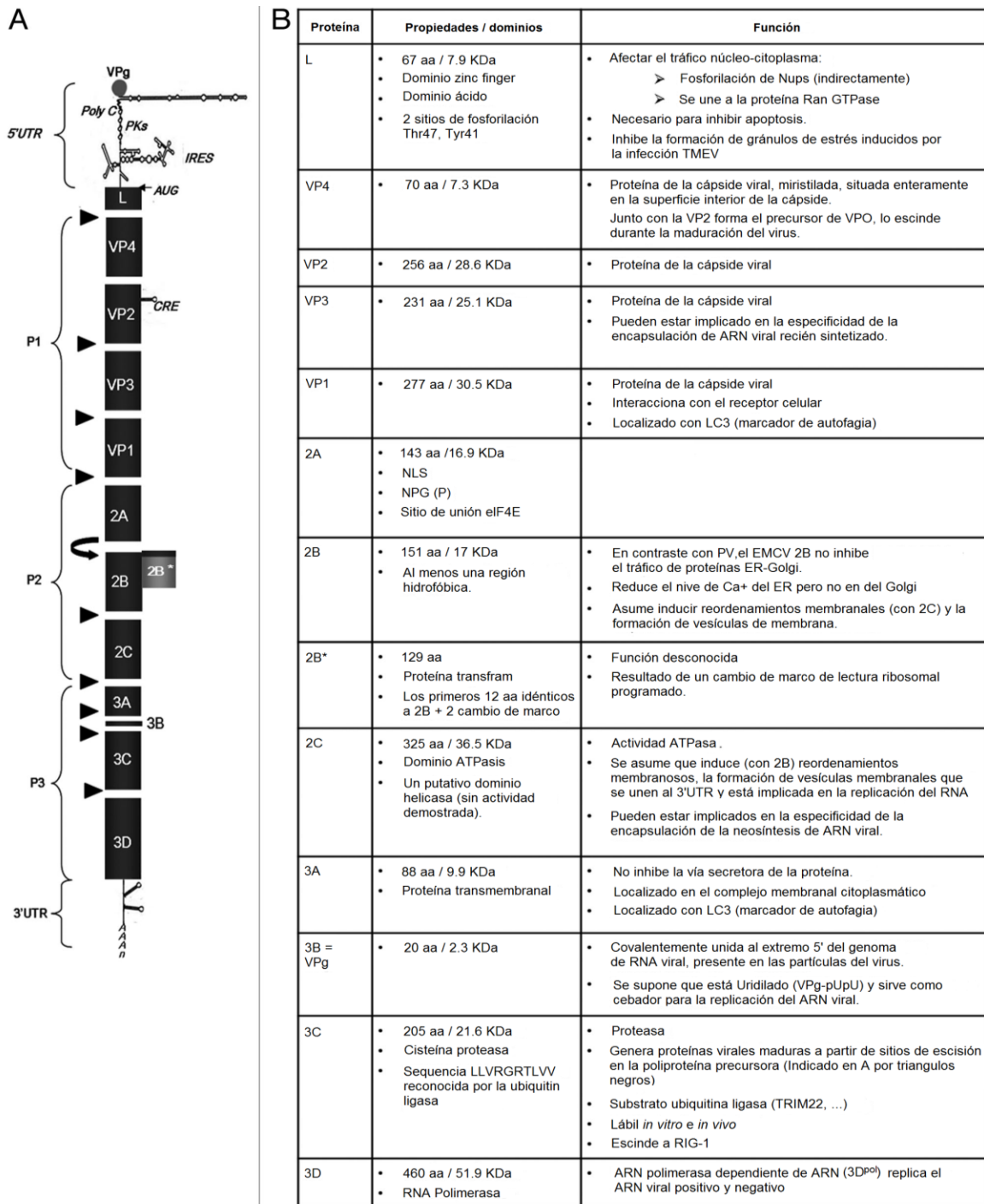
Dr. Jaime Federico Andrade Villanueva
Rector
Centro Universitario de Ciencias de la Salud



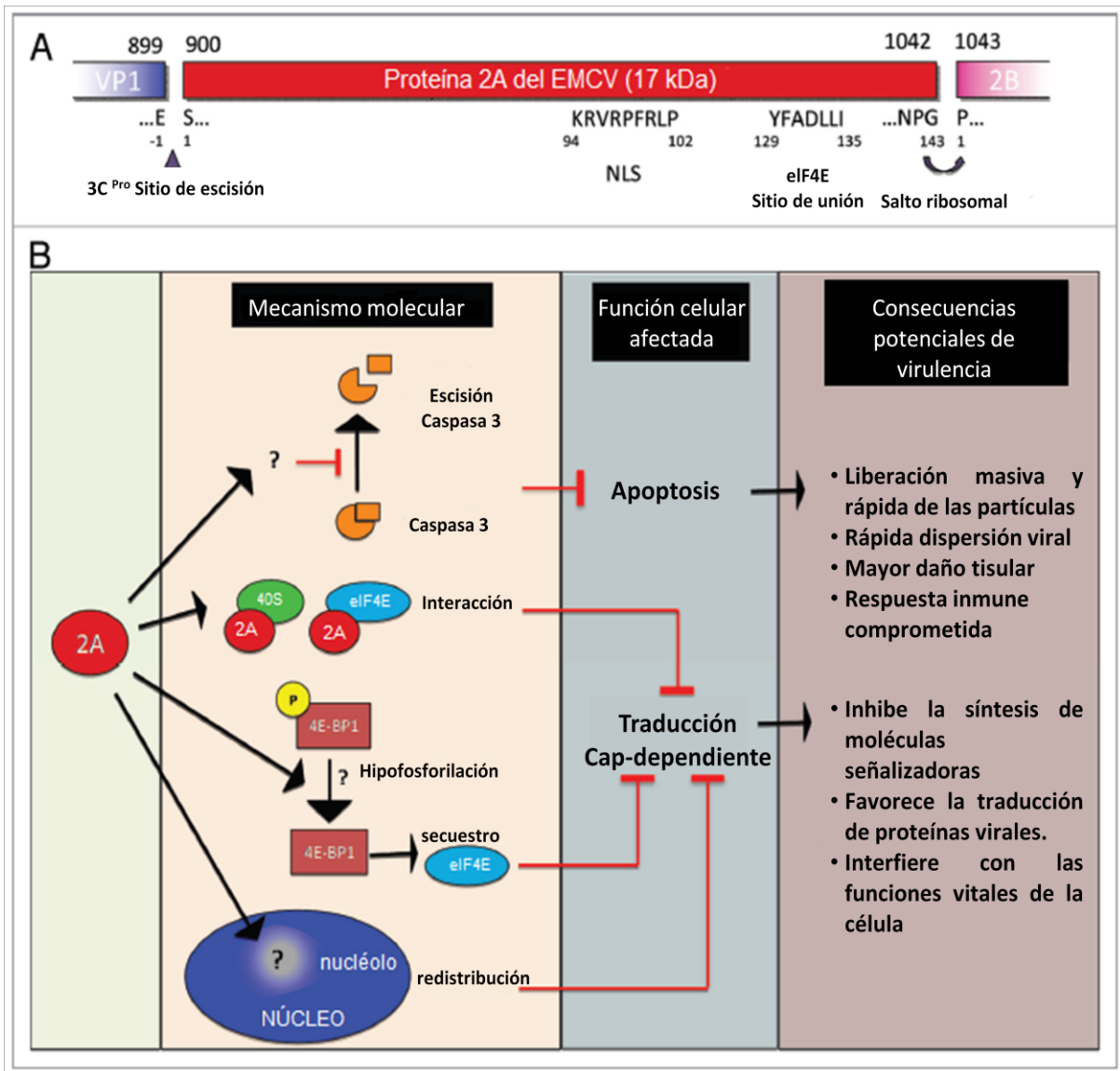
Dr. Sergio Fajardo Dueñas
Presidente Ejecutivo
XVI Congreso Internacional Avances en Medicina

XIII. ANEXOS

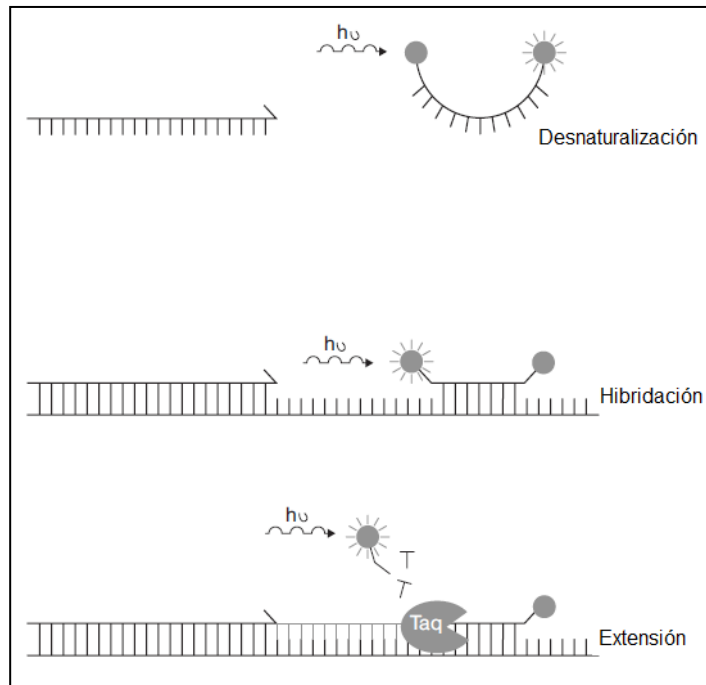
13.1 Figuras



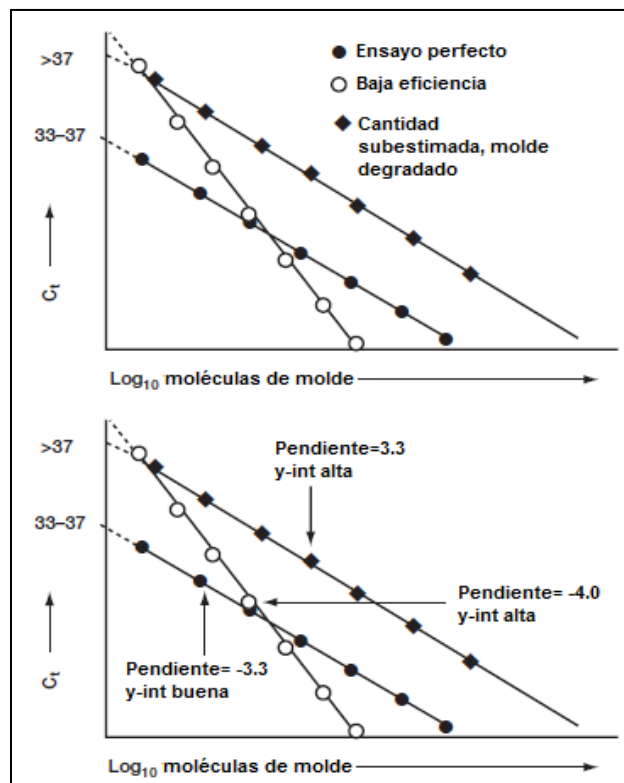
Anexo Figura 1. Organización del genoma del EMCV. El genoma consiste en un +ssRNA, unido covalentemente a la proteína viral VPg en 5', el genoma tiene dos UTR en el extremo 5' y 3' y un ORF que codifica para una poliproteína (gris oscuro). La poliproteína se escinde por la proteasa 3C (indicado con los triángulos negros). El segundo ORF (gris claro) se debe a un desplazamiento ribosomal +2. (B) Descripción de las proteínas del EMCV, propiedades y funciones conocidas o asumidas por similitud (Carocci & Bakkali-Kassimi, 2012).



Anexo Figura 2. Proteína 2A del virus de la Encefalomiocarditis. (A) Organización de la proteína 2A EMCV y la secuencia putativa. (B) Funciones de la proteína 2A EMCV y consecuencias potenciales de la virulencia del EMCV (Tomado de Carocci & Bakkali-Kassimi, 2012).



Anexo Figura 3. Generación de la señal de fluorescencia de una sonda TaqMan®. La liberación de la molécula donadora permitirá que su fluorescencia sea captada por el lector del equipo (Tomada de Tevfik, 2006).



Anexo Figura 4. Comparativo de eficiencias de las curvas estándar. Mostrando el comparativo de un ensayo con alta, subestimada y baja eficiencia (Tomada de Tevfik, 2006).

13.2 Tablas

Anexo Tabla 1. Ejemplos de productos biológicos (*Licensed Biological Products with Supporting Documents Food and Drug Administration "FDA" (2014), Sitio web: <http://www.fda.gov/biologicsbloodvaccines/ucm133705.htm>*).

Lista de ejemplos de productos biológicos (FDA)			
Tipos	Producto	Nombre comercial	Usos
Anticuerpos/ inmunoglobulinas	▶ Anti-B (Monoclonal murino)	Ninguno [Anti-B (Monoclonal murino)]	Investigación y el diagnóstico tipificación del grupo sanguíneo
	▶ Anticuerpo contra el antígeno de superficie de la hepatitis B (monoclonal de ratón)	Genetic Systems HBsAg EIA 3.0	Detección de hepatitis B Antígeno de superficie (HBsAg) en suero o plasma humano
	▶ Anti-globulina humana	Anti-Human Globulin Solidscreen II	Detección de la sensibilización de las células rojas de la sangre por la IgG con el TANGO™
	▶ Globulina antitimocito (conejo)	Timoglobulina	Tratamiento para el rechazo agudo de trasplante renal en relación con la inmunosupresión concomitante
Vacunas	▶ Vacuna BCG viva atenuada	Vacuna BCG	Prevención de la tuberculosis en personas que no han sido previamente infectadas por M. tuberculosis y que tienen un alto riesgo de exposición.
	▶ Vacuna inactivada contra Hepatitis A	Havrix	Inmunización activa contra la enfermedad causada por el virus de hepatitis A (VHA) en personas ≥ 12 meses de edad.
	▶ Vacuna contra el virus de la varicela (viva atenuada)	Varivax	Inmunización activa de personas de 12 meses de edad y mayores.
Toxoides	▶ Toxoides diftérico y tetánico adsorbidos, STN 10391	Ninguno [toxoides diftérico y tetánico adsorbidos]	Toxoides adsorbidos (Para uso pediátrico) (DT) está indicado para la inmunización activa de los niños hasta la edad de 7 años contra la difteria y el tétanos.
	▶ Toxoides tetánico y diftérico adsorbidos para adultos	DECAVAC	Inmunización activa para la prevención del tétanos y la difteria (uso en personas de 7 años de edad o más)
Proteínas/ Péptidos	▶ Inhibidor de la C1 esterasa, humano	Berinerit	Tratamiento en ataques abdominales o faciales agudos en angioedema hereditario (AEH) de pacientes adultos y adolescentes
Componentes de la sangre	▶ Proteína C concentrada (humana)	CEPROTIN	Tratamiento de pacientes con deficiencia congénita de la Proteína C para la prevención y el tratamiento de trombosis venosas
	▶ Factor XIII concentrado (humano)	Corifact	Tratamiento profiláctico de la hemorragia quirúrgica en pacientes adultos y pediátricos con deficiencia congénita del factor XIII
	▶ Complejo factor IX	Profilnine® SD	Prevención y el control de hemorragias en pacientes con deficiencia de factor IX por hemofilia B
	▶ Fibrinógeno concentrado (humano)	RiaSTAP	Tratamiento de episodios agudos de sangrado en pacientes con deficiencia congénita de fibrinógeno (afibrinogenemia y hipofibrinogenemia).
	▶ Plasma (Ser humano) tratado solvente / detergente	Octaplas	Sustitución de múltiples factores de coagulación en pacientes con deficiencias adquiridas
Antitoxina	▶ Antitoxina contra el Botulismo Heptavalente (A, B, C, D, E, F, G)-(Equina)	BAT	tratamiento del botulismo sintomática después de una exposición documentada o sospechada a serotipos de neurotoxina botulínica A, B, C, D, E, F o G
Hormonas	▶ Gonadotropina Coriónica Humana (hCG)	Pregnyl	Tratamiento hormonal

Anexo Tabla 2. Ejemplos de productos biotecnológicos (*Licensed Biological Products with Supporting Documents Food and Drug Administration "FDA" (2014), Sitio web: <http://www.fda.gov/biologicsbloodvaccines/ucm133705.htm>*)

Lista de ejemplos de productos biotecnológicos (FDA)			
Tipos	Producto	Nombre comercial	Usos
Anticuerpos/ antígenos	▶ Antígeno de Trypanosoma cruzi (<i>T. cruzi</i>) (<i>E. coli</i> , recombinante)	Abbott ESA Chagas	Como una prueba adicional, más específica en suero humano o plasma, utilizando una prueba de detección con licencia para anticuerpos contra <i>T. cruzi</i>
	▶ inmunoensayo enzimático (EIA) / recombinante para tipos Humanos Virus de la Inmunodeficiencia 1/2	HIVAB HIV-1 / HIV-2 (rDNA) EIA	Diagnostico basado en anticuerpos para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)
	▶ Antígeno del virus de la Hepatitis C (recombinante / Sintético) (RIBA)	CHIRON RIBA HCV 3.0 ensayo de inmunotransferencia	Ensayo de inmunotransferencia, incluye las proteínas recombinantes NS5 y C33; péptidos sintéticos C100P, 5-1-1p y c22p para detectar anticuerpos contra virus de hepatitis C en suero o plasma humano.
Vacunas	▶ Vacuna recombinante del Virus del Papiloma Humano (VPH) (Tipos 6, 11, 16, 18)	Gardasil	Prevención de cáncer vulvar y vaginal. Vacunación en personas de entre 9 a 26 años para la prevención del cáncer y lesiones precancerosas asociadas al virus del papiloma humano (VPH) tipos 6, 11, 16 y 18
	▶ Vacuna de Hepatitis A inactivada y hepatitis B (Recombinante)	TWINRIX	Inmunización activa de personas de 18 años o más años de edad contra la enfermedad causada por el virus de hepatitis A y la infección los subtipos conocidos del virus de la hepatitis B.
	▶ Vacuna de la Hepatitis B (recombinante)	RECOMBIVAX HB	Vacunación contra la infección causada por todos los subtipos conocidos del virus de la hepatitis B
Ácidos nucleicos sintéticos	▶ Prueba para el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1 pruebas de ácidos nucleicos / sintético)	APTIMA HIV-1 RNA Qualitative Assay	Detección cualitativa del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) en plasma humano. Está destinado para ayudar en el diagnóstico de la infección VIH-1, incluyendo la infección aguda o primaria
Proteínas/ Péptidos	▶ Factor anti-hemofílico (recombinante)	ReFacto	Control y prevención de episodios hemorrágicos y en la rutina de corto plazo, así como en la profilaxis quirúrgica de pacientes con hemofilia A
	▶ Antitrombina (Recombinante)	ATryn	Prevención de eventos tromboembólicos perioperatorio y peri-parto, en pacientes con deficiencia de antitrombina hereditaria.
	▶ Trombina, tópica (Recombinante)	RECOTHROM	Ayuda a la hemostasia del rezumado sanguíneo y sangrado leve de los capilares y pequeñas vénulas accesibles y control de la hemorragia mediante técnicas quirúrgicas estándar
Componentes de la sangre	▶ Factor de la coagulación IX (Recombinante)	ALPROLIX	Tratamiento de la hemofilia B: (1) El control y la prevención de episodios hemorrágicos, (2) manejo perioperatorio, (3) Profilaxis de rutina para prevenir o reducir la frecuencia de los episodios de sangrado
	▶ Factor de la coagulación XIII subunidad-A (Recombinante)	TRETTEN	Indicado para la profilaxis de hemorragias en pacientes con deficiencia congénita del factor XIII subunidad-A
Hormonas	▶ Eritropoyetina humana recombinante	EXETIN-A	Tratamiento sustitutivo en la deficiencia de eritropoyetina
	▶ Coriogonadotropina alfa (similar a la gonadotropina corionica humana)	Ovitrelle	Tratamiento hormonal usado en pacientes sometidas a técnicas de reproducción
	▶ Insulina humana (recombinante)	Humulin	Tratamiento de la diabetes

Anexo Tabla 3. Ejemplos de procesos usados para la eliminación viral/inactivación viral (Tomada de www.bioreliance.com).

Inactivación	Fraccionamiento
<p>Tratamiento por calor</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pasteurización • Liofilización/ calor seco <p>Solventes y Detergentes</p> <p>Tratamiento pH</p> <ul style="list-style-type: none"> • Un pH bajo (elución de la columna) • Un pH alto (desinfección) <p>Luz ultravioleta de onda corta (UVC)</p> <p>Rayos Gamma (poco usado)</p>	<p>Precipitación</p> <ul style="list-style-type: none"> • Etanol • Polietilenglicol <p>Cromatografía</p> <ul style="list-style-type: none"> • Intercambio iónico • Afinidad • Interacción hidrófoba • De fase inversa <p>Eliminación de virus por filtración (para materiales no viscosos)</p>

13.3 Protocolos

Anexo Protocolo 1. Centrifugado QIAamp® Viral RNA de QIAGEN® para la extracción de RNA viral (QIAGEN®, 2007).

PROCEDIMIENTO:

1. Pipetear 560µL del tampón AVL ya preparado en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.
2. Añadir 140 µL de plasma, suero, orina, sobrenadante de cultivo celular, o fluido corporal libre de células al tampón de RNA carrier-AVL en el tubo de microcentrífuga. Mezclar en un vórtex durante 15 s.
3. Incubar a T.A. (15-25 °C) durante 10 min. La lisis de la partícula viral está completa después de la lisis durante 10 min a T.A.
4. Centrifugar brevemente el tubo para eliminar las gotas en el interior de la tapa.
5. Añadir 560 µL de etanol (96-100%) a la muestra, y mezclar en un vórtex durante 15 s. Después centrifugar brevemente el tubo para retirar las gotas de dentro de la tapa. Debe ser utilizado sólo etanol ya que otros alcoholes pueden reducir el rendimiento del RNA y su pureza.
6. Añadir cuidadosamente 630 µL de la solución del paso 5 a la columna QIAamp Mini (con un tubo colector de 2 ml) sin mojar el borde. Cerrar la columna y centrifugar a 6000 x g (8.000 rpm) durante 1 min. Colocar la Mini columna QIAamp en un tubo colector limpio de 2 ml y desechar el tubo que contiene el filtrado. Mantener cerrada la columna en cada paso con el fin de evitar contaminación cruzada durante la centrifugación.
7. Abrir cuidadosamente el Mini columna QIAamp y repetir el paso 6
8. Abrir cuidadosamente la Mini columna QIAamp y añadir 500 µL del tampón AW1. Cerrar el tapón de la columna y centrifugar a 6000 x g (8.000 rpm) durante 1 min. Colocar la Mini columna QIAamp en un tubo recolector limpio de 2 mL y desechar el tubo que contiene el filtrado.
9. Abrir cuidadosamente la Mini columna QIAamp y añadir 500 µL del tampón AW2. Cerrar el tapón y centrifugar a toda velocidad (20.000 x g, 14 000 rpm) durante 3 min. Nota: El tampón AW2 residual en el recolectado puede causar problemas en las aplicaciones posteriores, por lo que se recomienda realizar el paso 10.
10. Recomendación: Colocar la Mini columna QIAamp en un nuevo tubo recolector de 2 mL, y desechar el viejo tubo de recolección con el filtrado. Centrifugar a velocidad máxima durante 1 min.
11. Colocar la Mini columna QIAamp en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL limpio (no incluido). Desechar el anterior tubo recolector que contiene el filtrado. Abrir cuidadosamente la Mini columna QIAamp y añadir 60 µL de agua ultrapura, cerrar la tapa, e incubar a T.A. durante 1 min. Posteriormente centrifugar a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 min. El RNA viral es estable durante máximo un año cuando se almacena a -20 ° C o -70 ° C.

Nota: el amortiguador de AVL y AW1 contienen sales de guanidina, que pueden formar compuestos altamente reactivos cuando se combina con cloro.

Anexo Protocolo 2. Protocolo síntesis de cDNA mediante la enzima M-MLV RT de Invitrogen™.

Para un volumen de reacción de 20 μL , se pueden usar de 1-5 ng de RNA total o de 1-5000 ng de RNA mensajero.

Agregar los siguientes componentes a un tubo de microcentrifuga (libre de nucleasas):

Componentes	Concentración 1x	Volumen 1x
Random primers (10 mM)	500 nM	1 μL
RNA	---	10 μL
Mezcla dNTPs (10 mM)	500 nm	1 μL
Volumen parcial		12 μL

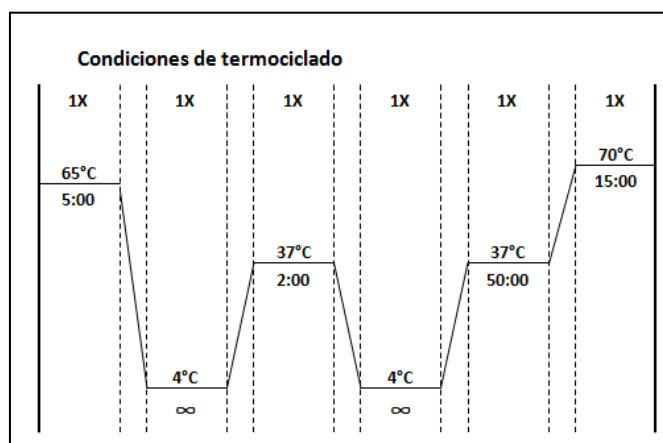
Calentar la mezcla a 65°C durante 5 min y pasar rápidamente en hielo, centrifugar brevemente y agregar:

Componentes	Concentración 1x	Volumen 1x
5X First Strand Buffer	1x	4 μL
DTT (0.1 M)	0.01 M	2 μL
RNaseOUT™ (40 U/ μL)	1 unidad	0.5 μL
H ₂ O ultrapura	---	1 μL
Volumen parcial		19.5 μL

Mezclar el contenido gentilmente e incubar a 37°C durante 2 min, posteriormente centrifugar y agregar:

Componentes	Concentración 1x	Volumen 1x
M-MLV RT (200 U/ μL)	2 unidades	0.5 μL
Volumen final		20 μL

Incubar a 37 °C por 50 min y después inactivar por calor a 70 °C por 15 min.



Almacenar a -20°C hasta su uso.

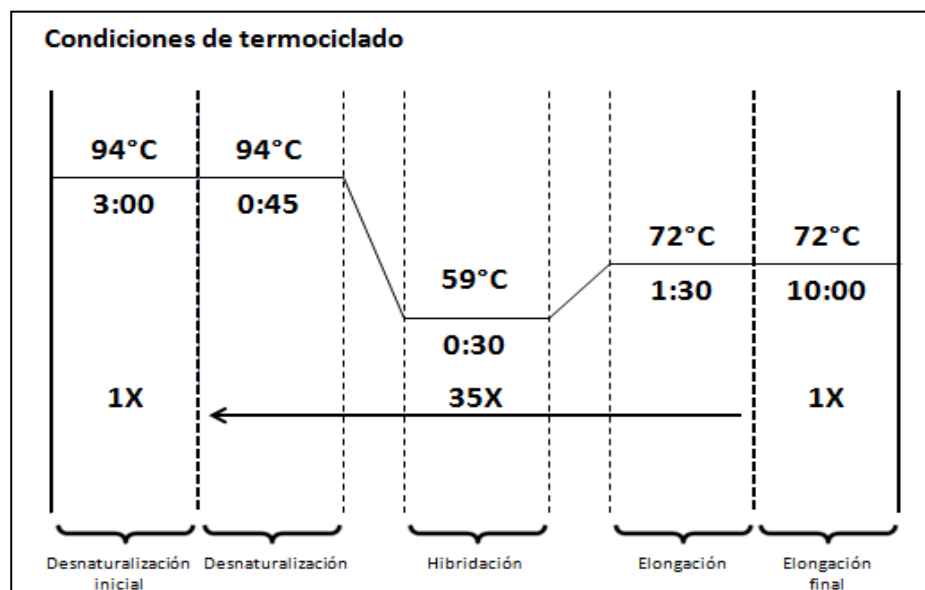
Anexo Protocolo 3. PCR punto final

Para la PCR punto final se realizó una mezcla de reacción (Master mix) en el cual se incorporaron todos los componentes necesarios para la amplificación del producto deseado de PCR:

Componentes	Concentración 1x	Volumen 1x
Buffer 10x	1x	2.5 µL
dNTPs (10 mM)	200 nM	0.5 µL
MgCl ₂ (50 mM)	1.5 mM	0.75 µL
Oligonucleótido sentido EMCV (20 µM)	400 nM	0.5 µL
Oligonucleótido anti-sentido EMCV (20 µM)	400 nM	0.5 µL
H ₂ O ultrapura	---	17.65 µL
Taq Pol (200 U/µL)	0.8 unidades	0.1 µL
Volumen total		22.5 µL

Posteriormente, se agregaron 2.5 µL de muestra (cDNA) o 2.5 µL de H₂O ultrapura el cual funciona como control negativo (NTC, del inglés *No template control*) permitiendo descartar contaminación cruzada entre las muestras, mientras que un control positivo que permite descartar la presencia de inhibidores en la reacción.

El programa utilizado (excepto en gradiente) es el siguiente.



Posteriormente, se realizó una electroforesis con los productos de la PCR punto final con el fin de observar las propiedades del producto amplificado; por lo que se preparó un gel de agarosa al 1% con TBE (1x), y se agregó el colorante SYBR safe® invitrogen™ a una concentración de 1x y como marcador de peso molecular se utilizaron 3 µL de 1 kb *Plus DNA Ladder* de Invitrogen™ y a las muestras se les adicionó 4 µL de amortiguador de carga tipo III (Sambrook & Russell, 1989). El corrimiento electroforético se llevó a cabo durante 1 h a 100 v. constantes.

Anexo Protocolo 4. Protocolo de clonación TOPO 2.1® TA Cloning® de productos de sintetizados por PCR con la Taq polimerasa para células *E. coli* quimiocompetentes.

En la siguiente tabla se muestran las concentraciones para preparar la reacción de clonación en un volumen final de 3 µL.

Nota: El color rojo de la solución vector TOPO® es normal y se utiliza para visualizar la solución.

Reactivos	Concentración	Volumen
Producto fresco de PCR	---	2 µL
Solución salina 1.2 M de NaCl, 0.06 M MgCl ₂	0.2 M de NaCl, 0.01 M MgCl ₂	0.5 µL
Vector TOPO 2.1®(10 ng/µL)	5 ng	0.5 µL
Volumen final		3 µL

Para llevar a cabo la reacción de clonación en TOPO®:

1. Mezclar los reactivos de la reacción suavemente en un tubo Eppendorf e incubar durante 5 min a T.A. (22-23 ° C).
2. Al finalizar el tiempo de incubación, colocar inmediatamente el tubo con la reacción en hielo.

Componentes necesarios pero no suministrados:

- Placas de medio LB (Anexo Protocolo 6) que contengan 50 µg /mL de kanamicina.
- 40 mg / mL de X-gal en dimetilformamida (DMF).
- Un tubo de 15 ml de plástico de tapa a presión (estéril), por ejemplo Falcón.
- Baño de agua a 42 °C.
- Agitar a 200 rpm/ 37 °C.
- Suministros microbiológicos generales (por ejemplo, placas, separadores, perlas de plástico, etc.).

Componentes suministrados con el kit:

- Medio S.O.C.

PROCEDIMIENTO:

1. Añadir 2 µL de la reacción de clonación TOPO® en un vial de células One Shot® de *E. coli* quimiocompetentes y mezclar suavemente (No pipetear arriba y abajo).
2. Incubar en hielo de 5-30 min (incubaciones más largas en el hielo no parecen afectar a la eficiencia de la transformación).
3. Dar un choque térmico a las células durante 30 s a 42°C sin agitación (baño de agua).
4. Transferir inmediatamente el tubo en hielo y añadir 250 µL de medio S.O.C. a T.A.
5. Transferir el contenido a un tubo Falcón de 15 mL y llevarlo al agitador a 200 rpm a 37°C por 1 h.
6. Esparcir 50 µL de la transformación en una placa selectiva (medio LB + kanamicina + Xgal) precalentada a 37°C. Para asegurar un reparto homogéneo en la superficie utilizar varillas o perlas de plástico.
7. Sellar las cajas de Petri con parafilm y colocarlas en el incubador a 37°C toda la noche para su posterior análisis.

Anexo Protocolo 5. Protocolo qPCR usando SYBR Green® y el Rotor LightCycler® de Roche.**Preparación de la mezcla de reacción “Master Mix”**

- 1) Descongelar un vial de “Mezcla de Reacción” (vial 1b, tapa verde) y el vial de “Enzima” (vial 1a, tapa blanca), centrifugarlos brevemente y después colocarlos en hielo.
- 2) Pipetear 14 μL del vial 1a dentro del vial. Cada vial 1a contiene suficiente enzima en la solución para 3 viales de “Mezcla de Reacción” (vial 1b).
- 3) Mezclar gentilmente pipeteando arriba y abajo. No utilizar el vórtex.
- 4) Re-etiquetar el vial 1b con la etiqueta de “Master Mix”. Mantener la mezcla protegida de la luz (almacenar en hielo hasta su uso).

Preparación de la mezcla de PCR

- 5) No tocar la superficie de los capilares y siempre utilizar guantes cuando se manipulan.
- 6) Colocar el numero requerido de capilares, según las muestras en los adaptadores de centrifuga pre-enfriado.
- 7) En un tubo de 1.5 mL preparar, la mezcla de reacción de la PCR para 10 μL por reacción, como se muestra a continuación.

Componentes de la mezcla de reacción	Concentración por reacción	Volumen para 10 μL de reacción
H ₂ O, grado ultrapura	----	7.6 μL
Mezcla de cebadores (mezcla S/AS EMCV)	0.4 μM	0.4 μL
Mezcla de reacción (vial 1, tapa verde) concentración 5X	1x	2 μL
Volumen total		10 μL

- 8) Pipetear 10 μL de la mezcla de PCR en cada capilar pre-enfriado y agregue 2 μL de DNA molde.
- 9) Colocar los capilares en una microcentrifuga con los adaptadores y centrifugar a 700 x g durante 5s (3000 Rpm).
- 10) Transferir los capilares al carrusel del equipo LightCycler®.
- 11) Realizar la corrida de qPCR con las siguientes condiciones.

Modo de análisis	Ciclos	Segmentos	Temperatura objetivo	Tiempo de mantenimiento	Modo de adquisición
Pre-Incubación					
Ninguno	1	95 °C	10 min	10 min	Ninguno
Amplificación					
Cuantificación	45	Desnaturalización	95 °C	10 s	Ninguno
		Alineación	Dependiendo del oligonucleótido	20 μL : 0-10s 100 μL : 30-45 s	Ninguno
		Extensión	72 °C	=amplificación [pb]/25s	individual
Curva de Fusión					
Curvas de fusión	1	Desnaturalización	95 °C	0 s	Ninguno
		Alineación	65 °C	60 s	Ninguno
		Fusión	95 °C rampa= 0.1 °C/s	0 s	Continuo
Enfriamiento					
Ninguno	1		40 °C	30 s	Ninguno

Anexo Protocolo 6. Preparación de Medio LB.

Concentración de los Reactivos Medio LB:

Reactivo	Concentración final
Luria-Bertani	15.5 g/L
Bacteriological agar	15 g/L
Kanamicina	50 µg/mL
X-gal	40 mg/mL

PROCEDIMIENTO

Agregar:

Luria-Bertani base Miller 15.5 g/L 2.015 g
Aforar a 130 mL con agua destilada.

Separar el LB en dos frascos uno con 60 mL y el segundo con 70 mL.

Agregar al frasco de 60 mL de LB, 0.9 g de agar bacteriológico y mezclar.

Llevar a esterilizar 121°C durante 15 min (programa ya determinado en la autoclave)

Medio LB para 6 placas (60 mL)

Tomar los 60 mL del medio con LB y esperar a que el medio se atempere y agregar:

Kanamicina (50 µg/mL)..... 30 µL

X-gal (40 mg/mL)..... 76.8 µL

Verter en las cajas de Petri (c/una aprox. 10 mL) Sellar y cubrir con papel aluminio y almacenar en el cuarto frío.

Medio LB líquido:

Los 70 mL restante de LB, dejar enfriar agregar

Kanamicina (50 µg/mL)..... 35 µL

Almacenar en tubos de falcón de 50 mL, sellar y almacenar en el cuarto Frio.