



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL**

**ESTANDARIZACIÓN DE PCR EN TIEMPO REAL PARA LA
IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE VIRUS EN LA INDUSTRIA
AVICOLA**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

PRESENTA

FERNANDO CHÁVEZ MAYA

TUTOR:

Rogelio Alejandro Alonso Morales

COMITÉ TUTORAL:

Gary García Espinosa

Álvaro Aguilar Setién

México D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A Bárbara y Fernando

AGRADECIMIENTOS

Gracias UNAM.

RESUMEN

Existe la necesidad de diagnosticar de manera rápida y eficiente las enfermedades virales aviares, la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (PCR-TR por sus siglas en inglés) es una técnica de biología molecular que presenta grandes ventajas para realizar este diagnóstico, entre ellas se puede mencionar su rapidez, alta especificidad, la posibilidad de cuantificar partículas virales, de detectar más de un virus en el mismo tubo, entre otras. En este trabajo se realizaron experimentos para demostrar que es posible desarrollar sistemas y procedimientos estandarizados de detección y cuantificación de tres de los virus aviares más importantes en la avicultura (influenza aviar (IA), enfermedad de Newcastle (EN) y bronquitis infecciosa (BI)) mediante PCR-TR en México. Se definió la región genómica más conservada de cada virus, ésta se utilizó para amplificar mediante PCR un fragmento de 779 pb del gen de la proteína M del virus de IA, un fragmento 121 pb del gen de la proteína M del virus EN y uno de 143 pb de la región 5' del virus de BI. Dichos segmentos se clonaron en plásmidos apropiados para ser utilizados como estándares de cuantificación en las reacciones de PCR-TR. Se obtuvieron líquidos alantoideos titulados de los virus de IA ($1 \times 10^{7.5}$ dosis infectante embrión de pollo 50% por ml (DIEP₅₀/ml)), EN ($1 \times 10^{8.7}$ DIEP₅₀/ml) y BI ($1 \times 10^{7.6}$ DIEP₅₀/ml). Se desarrollaron protocolos estandarizados para el procesamiento, amplificación y cuantificación de las muestras por PCR-TR, evaluando diferentes concentraciones de los componentes de la reacción. En la evaluación de los límites de sensibilidad de los ensayos se determinó que 10^4 copias (100fg) es la cantidad mínima de los plásmido controles posibles de detectar mediante PCR-TR. Se establecieron los niveles de reproducibilidad de los ensayos mediante el cálculo del coeficiente de correlación intraclase, obteniendo valores de 0.9833 para IA, 0.9675 para EN y 0.9800 para BI. Para cada muestra viral se determinaron los títulos empleando métodos virológicos y se evaluaron los límites de sensibilidad empleando PCR-TR, encontrando que se pueden detectar 1×10^3 DIEP₅₀ para IA, EN y BI. Realizando la comparación del número de unidades (DIEP₅₀/ml) y el número de moléculas de cada blanco de amplificación, por ml de líquido alantoideo, se obtiene que una unidad (DIEP₅₀) de IA equivale a 223.87 moléculas, en el caso del virus de EN es de 331.13 moléculas y para el virus de BI es de 1513.56 moléculas. Se logró amplificar y detectar cada fragmento diagnóstico de tres genomas virales en un mismo tubo (PCR-TR múltiple) de manera similar a la amplificación y detección independiente. Se definieron las condiciones de Transcripción Reversa y PCR-TR (RT-PCR-TR) en un solo paso.

Palabras clave: influenza aviar, enfermedad de Newcastle, bronquitis infecciosa, RT, PCR, PCR-TR.

ABSTRACT

There is need to diagnose quickly and efficiently avian viral diseases, Real Time Polymerase Chain Reaction (PCR-TR) is a technique of molecular biology which presents great benefits for diagnosis, including its speed, high specificity, the possibility to quantify virions, to detecting more than a virus into the same tube, among others. In this work we developed standardized procedures for detection and quantification by PCR-TR of three of the most important viruses in poultry in México (avian influenza (AI) Newcastle disease (ND) and infectious bronchitis (IB)). We selected a conserved genomic region from each virus, and amplified them by PCR: a fragment of 779 bp of the gene of the protein M of AI virus, a 121 bp of the gene of the M protein of ND virus and a fragment of 143 bp of the genome of IB virus. These segments were cloned in appropriate plasmids to be used as standards in quantification by PCR-TR. We obtained tittered allantoic fluid of the viruses AI ($1 \times 10^{7.5}$ dose of 50% in chicken embryos (IDCE₅₀/ml)), ND ($1 \times 10^{8.7}$ IDCE₅₀/ml) and IB ($1 \times 10^{7.6}$ IDCE₅₀/ml). We developed standardized protocols to quantitate samples by PCR-TR. The sensitivity of the assays was 10^4 copies (100fg) as the minimum quantity of plasmids detectable by qPCR. To establish the levels of repeatability of the assays using the coefficient of intraclass correlation, we obtained values of 0.9833 for AI, 0.9675 for ND and 0.9800 for IB. For each viral sample we determined the limits sensitivity using virological methods we as compared to qPCR which was 1×10^3 IDCE₅₀ for IA, ND and IB. We also determined that one IDCE₅₀ is equivalent to 223.87 molecules of IA, of ND is 331.13 and of IB is 1513.56. We also diagnosed all three viral genomes in a same tube (multiplex qPCR) similar to the amplification of the separate genomes.

Key words: avian influenza, Newcastle disease, infectious bronchitis, RT, PCR, PCR-TR.

ÍNDICE

	Página
Caratula.....	i
Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Resumen.....	iv
Abstract.....	v
Índice.....	vi
Índice de cuadros.....	vii
Índice de figuras.....	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Marco Teórico.....	1
1.1.1. PCR.....	1
1.1.2. PCR en Tiempo Real.....	3
1.1.3. Ventajas de la PCR en Tiempo Real.....	5
1.1.4. Virus Aviaries.....	6
1.1.4.1. Influenza aviar.....	6
1.1.4.2. Enfermedad de Newcastle.....	7
1.1.4.3. Bronquitis infecciosa.....	9
1.1.5. Justificación.....	11
1.1.6. Hipótesis.....	11
II. OBJETIVOS.....	12
2.1. Objetivo General.....	12
2.2. Objetivos Particulares.....	12
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
3.1. Oligonucleótidos.....	13
3.1.1.- Influenza.....	13
3.1.2.- Enfermedad de Newcastle.....	14
3.1.3.- Bronquitis infecciosa.....	15
3.2. Obtención de muestras.....	15
3.3.- Clonación de los controles de amplificación.....	16
3.3.1.- Amplificación de segmentos control.....	16
3.3.2.- Clonación de los segmentos diagnósticos de los virus de IA, EN y BI.....	16
3.3.3.- Amplificación y purificación del ADN de los plásmidos controles.....	17
3.4.- Cuantificación de los plásmidos.....	17
3.5.- Condiciones de PCR-TR.....	17
3.6.- Sensibilidad.....	19
3.7.- Cuantificación del número de copias virales y reproducibilidad de los ensayos.....	19
3.8.- Comparación de títulos virales.....	19
3.9.- Detección de más de un virus en un tubo.....	20
3.10.- Transcripción reversa y PCR-TR en un solo paso múltiple	23
IV. RESULTADOS.....	26
4.1. Clonación de los controles de amplificación.....	26
4.1.1.- Amplificación de segmentos control.....	26

4.1.2.- Clonación de los segmentos diagnósticos.....	28
4.1.3.- Purificación de los plásmidos.....	28
4.2.- Cuantificación de los plásmidos.....	30
4.3.- Sensibilidad.....	33
4.4.- Detección y cuantificación del número de copias virales presentes en muestras controles de líquido alantoideo y reproducibilidad de los ensayos.....	37
4.5.- Comparación de títulos virales.....	38
4.6.- Detección de más de un virus en un tubo.....	39
4.7.- Transcripción Reversa y PCR-TR en un solo paso múltiple.....	51
V. DISCUSIÓN.....	54
5.1. Sensibilidad.....	54
5.2. Reproducibilidad.....	58
5.3. Comparación de títulos virales.....	59
5.4. Detección de más de un virus en un tubo (PCR-TR múltiple).....	59
5.5. RT-PCR-TR múltiple en un tubo.....	60
5.6. Especificidad.....	61
VI. CONCLUSIONES.....	62
VII. LITERATURA CITADA.....	63
VIII. ANEXOS.....	66
<i>Anexo 1.</i> Técnica de titulación del virus de EN y BI.....	66
<i>Anexo 2.</i> Extracción de ARN viral a partir de líquido alantoideo	70
<i>Anexo 3.</i> Condiciones de transcripción Reversa (RT).....	71
<i>Anexo 4.</i> Condiciones de PCR Punto Final para la amplificación de los segmentos controles.....	72
<i>Anexo 5.</i> Purificación de fragmentos de ADN a partir de gel de agarosa.....	73
<i>Anexo 6.</i> Ligación de productos de PCR a plásmidos.....	74
<i>Anexo 7.</i> Transformación bacteriana.....	75
<i>Anexo 8.</i> Purificación de plásmidos... ..	77
<i>Anexo 9.</i> Cuantificación de ADN de los plásmidos.....	79
<i>Anexo 10.</i> Determinación del límite de sensibilidad de amplificación para los plásmidos.....	82
<i>Anexo 11.</i> Reproducibilidad.....	84

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 3.1.1.1. Iniciadores para la amplificación de un fragmento de 779 pb del gen de la proteína M de Influenza Aviar por PCR.....	13
Cuadro 3.1.1.2. Oligonucleótidos para detectar el virus de IA mediante PCR-TR.....	14
Cuadro 3.1.2.1. Oligonucleótidos para detectar el virus de EN mediante PCR-TR.....	14
Cuadro 3.1.3.1. Oligonucleótidos para detectar el virus de BI mediante PCR-TR.....	15
Cuadro 3.2.1. Títulos virales de los aislados de IA, EN y BI.....	16
Cuadro 3.5.1. Condiciones dd bada reactivo para la PCR-TR.....	18

Cuadro 3.5.2. Condiciones de temperatura para la PCR-TR.....	18
Cuadro 3.9.1. Construcción de la curva estándar utilizando los plásmidos pIAMT, pJETENM y pJETBI5' y los oligonucleótidos M+25, M-124 y M+64; M+4100, M-4220 y M+4169; IBV5'GE391, IBF5'GL533 y IBV5'G probe.....	21
Cuadro 3.9.2. Construcción de la curva estándar para la evaluación de la detección del fragmento de 121 pb.....	21
Cuadro 3.9.3. Construcción de la curva estándar para la evaluación de la detección del fragmento de 143 pb.....	22
Cuadro 3.9.4. Construcción de la curva estándar para la evaluación de la detección del fragmento de 101 pb.....	22
Cuadro 3.9.5. Construcción de la curva estándar para la evaluación de la detección del fragmento de 121 pb.....	22
Cuadro 3.9.6. Construcción de la curva estándar para la evaluación de la detección del fragmento de 143 pb.....	23
Cuadro 3.9.7. Construcción de la curva estándar para la evaluación de la detección del fragmento de 101, 121 y 143 pb.....	23
Cuadro 3.10.1. Ingredientes de la RT-PCR-TR.....	25
Cuadro 4.2.1. Cuantificación del ADN de los plásmidos purificados (pIAMT, pJETENM y pJETBI5').....	31
Cuadro 4.2.2. Tamaño del inserto clonado.....	31
Cuadro 4.4.1. Cuantificación viral y grado de reproducibilidad de los resultados en tres líquidos alantoideos.....	37
Cuadro 4.5.1. Comparación de la cuantificación del número de moléculas y títulos virales para cada virus.....	38
Cuadro 4.7.1. Cuantificación de los virus IA, EN y BI mediante Transcripción Reversa y PCR-TR.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pagina
Figura 4.1.1.1. Amplificación del fragmento de 779 pb del gen de la proteína M del virus de IA.....	26
Figura 4.1.1.2. Amplificación del fragmento de 121 pb del gen de la proteína M del virus de EN.....	27
Figura 4.1.1.3. Amplificación del fragmento de 143 pb de la región 5' del genoma del virus de BI.....	27
Figura 4.1.3.1. Purificación del plásmido pIAMT.....	29

Figura 4.1.3.2. Purificación del plásmido pJETENM.....	29
Figura 4.1.3.3. Purificación del plásmido pJETBI5'	30
Figura 4.2.1. Curva estándar de la cuantificación de pIAMT.....	32
Figura 4.2.2. Curva estándar de la cuantificación de pJETENM.....	32
Figura 4.2.3. Curva estándar de la cuantificación de pJETBI5'	33
Figura 4.3.1. Comparación de las señales de amplificación de diferentes cantidades de ADN del plásmido pIAMT mediante PCR-TR.....	34
Figura 4.3.2. Comparación de las señales de amplificación de diferentes cantidades de ADN del plásmido pJETENM mediante PCR-TR.....	35
Figura 4.3.3. Comparación de las señales de amplificación de diferentes cantidades de ADN del plásmido pJETBI5' mediante PCR-TR.....	36
Figura 4.6.1. Ensayo de interferencia de 3 blancos de amplificación en la amplificación específica del plásmido pIAMT.....	40
Figura 4.6.2. Ensayo de interferencia de 3 blancos de amplificación en la amplificación del plásmido pJETENM.....	41
Figura 4.6.3. Ensayo de interferencia de 3 blancos de amplificación en la amplificación del plásmido pJETBI5'	42
Figura 4.6.4. Ensayo de interferencia de 3 juegos de oligonucleótidos y sodas en la amplificación específica del plásmido pIAMT.....	44
Figura 4.6.5. Ensayo de interferencia de 3 juegos de oligonucleótidos y sodas en la amplificación específica del plásmido pJETENM.....	45
Figura 4.6.6. Ensayo de interferencia de 3 juegos de oligonucleótidos y sodas en la amplificación específica del plásmido pJETBI5'	46
Figura 4.6.7. Ensayo de interferencia de 3 blancos de amplificación en la amplificación del plásmido pIAMT.....	48
Figura 4.6.8. Ensayo de interferencia de 3 blancos de amplificación en la amplificación del plásmido pJETENM.....	49
Figura 4.6.9. Ensayo de interferencia de 3 blancos de amplificación en la amplificación del plásmido pJETBI5'	50
Figura 4.7.1. Curvas estándar de amplificación construidas con los plásmidos pIAMT, pJETENM y pJETBI5'	52

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
APMV-1	Paramixovirus aviar 1
BI	Bronquitis infecciosa
Ct	Threshold cycle
cDNA	ADN complementario
DEPC	Dietilpirocarbonato
DIEP ₅₀	Dosis infectante embrión de pollo 50%
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
EN	Enfermedad de Newcastle
F	Proteína de fusión
HA	Hemaglutinina
HPAI	Influenza de alta patogenicidad
IA	Influenza aviar
IBV	Virus de bronquitis infecciosa
L	RNA polimerasa
LPAI	Influenza de baja patogenicidad
M	Proteína de matriz
N	Nucleoproteína
NA	Neuramindasa
NDV	Virus de la enfermedad de Newcastle
ng	Nanogramo
P	Fsofoproteína
pb	Par de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR-TR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
pIAMT	Plásmido con el fragmento de 101 pb del gen M del virus de IA
pJETBI5'	Plásmido con el fragmento de 143 pb del extremo 5' del virus de BI
pJETENM	Plásmido con el fragmento de 121 pb del gen M del virus de EN
RFLP	Plomorfismo de fragmentos de restricción
RT	Transcriptasa reversa
RT-PCR	Transcriptasa reversa-reacción en cadena de la polimerasa
RT-PCR-TR	Transcriptasa reversa-reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
Taq	ADN polimerasa de <i>Termophilus Aquaticus</i>
µl	Microlitro

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Marco Teórico

1.1.1. PCR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa, (PCR por sus siglas en inglés), es un método enzimático utilizado para obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN in vitro, partiendo de una pequeña cantidad. La técnica se basa en la replicación del ADN, realizada por la ADN polimerasa, la cual sintetiza una cadena complementaria de ADN en el sentido 5'–3' utilizando una plantilla de ADN de cadena sencilla, pero a partir de una región de doble cadena (plantilla-iniciadores). Los iniciadores son complementarios a cada uno de los extremos 3' del fragmento que se desea amplificar^{1,2}.

Para llevar a cabo la PCR se necesitan: 1) desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), los cuales son dATP, dGTP, dCTP y dTTP, estos proporcionan energía y el sustrato para las nuevas cadenas de ADN y deben añadirse a la reacción en concentraciones iguales; 2) iniciadores, (oligonucleótidos), que flanquean el sitio blanco de amplificación de ADN; 3) iones de magnesio (Mg^{2+}), agregados comúnmente como cloruro de magnesio ($MgCl_2$), un cofactor de la polimerasa; 4) una solución tampón que mantiene el pH adecuado para la reacción; 5) ADN polimerasa (Taq, de *Thermus aquaticus*), es la enzima que ensambla los eslabones de desoxinucleótidos formando nuevas cadenas de ADN; 6) ADN molde, a partir del cual se multiplica el fragmento blanco. Estos componentes se procesan en un termociclador, que es el aparato que proporciona las temperaturas necesarias para que se lleve a cabo la reacción^{1,2}.

La PCR se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas. La primera es la desnaturalización del ADN de doble cadena, en esta se separan las dos hebras en dos cadenas sencillas (alrededor de 95°C). La segunda es la hibridación de los iniciadores, los oligonucleótidos se unen a los extremos 3' del

fragmento que se desea amplificar, (alrededor de los 50°C). La tercera es la extensión de la nueva cadena de ADN, la ADN polimerasa sintetiza nuevas cadenas de ADN, complementarias a la cadena molde, partiendo del extremo 3' de cada iniciador como soporte a partir del cual se inicia la elongación de las nuevas cadenas. La elongación de la nueva cadena sintetizada por la ADN polimerasa se produce en dirección 5'-3' (alrededor de 72°C). La desnaturalización, la hibridación y la extensión, se repite usualmente 35 ciclos^{1,2,3}.

En la amplificación de un segmento de ADN mediante PCR se siguen tres pasos principales, primero se extraen y purifican los ácidos nucleicos, de la muestra, después se amplifica el segmento de ADN de interés, y finalmente se detecta el fragmento que se amplificó mediante electroforesis^{2,3}.

Dentro de las aplicaciones de la PCR, se encuentra la identificación de microorganismos, como una alternativa a su aislamiento (por ejemplo en el caso de los virus el aislamiento mediante cultivo celular o en embrión de pollo), análisis de marcadores genéticos, pruebas de paternidad, sexado de individuos sin dimorfismo sexual, estudio de expresión de genes, entre otras^{2,3}.

Los falsos negativos en la PCR pueden ser producidos por sustancias que inhiben la reacción, es por ello que es indispensable introducir controles. Debido a la alta sensibilidad de la PCR, hay un alto riesgo de contaminación con fragmentos de ADN amplificados previamente en el laboratorio, que pueden contaminar reactivos, superficies y materiales y producir falsos positivos. Por lo tanto hay que tomar una serie de precauciones de diversa índole, que incluyen una distribución del laboratorio en distintas áreas de trabajo (pre y post-PCR), la adopción de hábitos de trabajo que minimizan el riesgo de contaminación, el uso de material especial o el empleo de sistemas anticontaminación, como la irradiación de superficies y reactivos con luz ultravioleta etc^{2,3}.

Cuantificar el ADN amplificado en la reacción de PCR es complicado, ya que la eficacia de la amplificación va disminuyendo con el tiempo hasta que la reacción llega a una fase de saturación en la que ya no se produce amplificación

del ADN. Debido a que los fragmentos amplificados se detectan al final de la reacción, la cantidad de ADN obtenido no suele guardar relación con la concentración inicial. Además como la amplificación en la PCR es exponencial, pequeñas variaciones en la eficiencia de la reacción se traduce en importantes variaciones en la cantidad de ADN obtenido^{2,3}.

1.1.2. PCR en Tiempo Real

La amplificación del ADN así como su detección, se llevan a cabo al mismo tiempo en la PCR en tiempo real (PCR-TR). La detección de los productos amplificados se lleva a cabo gracias a los agentes intercalantes o sondas específicas marcadas con fluorocromos. Los agentes intercalantes son fluorocromos que aumentan la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de doble hélice, el más utilizado es el SYBR Green I. El incremento de ADN en cada ciclo es proporcional al de la fluorescencia emitida. Este sistema es más barato y mucho más fácil de estandarizar comparado con las sondas. Sin embargo tiene baja especificidad, debido a que se une a cadenas dobles de ADN indistintamente (dímeros de iniciadores, amplificaciones inespecíficas, etc.).

Las sondas de hibridación específicas, están 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. Las más utilizadas son las sondas de hidrólisis, denominadas también TaqMan, las sondas molecular beacons y las sondas FRET.

Las sondas de hidrólisis, son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5', que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra las moléculas donadora y aceptora deben estar especialmente próximas. El espectro de emisión de la primera se ha de solapar con el espectro de absorción de la segunda. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación del ADN blanco, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a

lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la ADN polimerasa, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador. Como donador y aceptor están, ahora, espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector³.

Las sondas molecular beacons, son sondas parecidas a las anteriores. Tienen una molécula donadora en el extremo 5' y una aceptor en el extremo 3' pero, además, presentan una estructura secundaria en forma de asa, en la que reside la secuencia de unión específica con el ADN diana. Los extremos permanecen plegados cuando la sonda no está hibridada, lo que conlleva que donador y aceptor estén muy cerca uno de otro. En esta conformación la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor y no es captada por el lector del equipo. Sin embargo, al hibridar con el ADN diana la sonda se abre, alejándose donador y aceptor, pudiendo ser detectada la fluorescencia emitida por el primero⁴.

Las sondas FRET se componen de dos sondas que se unen a secuencias adyacentes del ADN diana. Una de las sondas lleva un donador en el extremo 3' y la otra un aceptor en el extremo 5'. Cuando las sondas están hibridadas, los dos fluorocromos están próximos. El donador al ser excitado transfiere su energía al aceptor, que a su vez emite la fluorescencia que detecta el equipo⁴.

Con las sondas mencionadas anteriormente, la fluorescencia emitida (la cual es captada por el termociclador), es directamente proporcional a la hibridación de las sondas lo cual es respuesta a un aumento de la síntesis de los amplicones. El empleo de sondas garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales, pero su costo es más elevado que el SYBR Green I y la optimización de las condiciones de la reacción resulta más difícil⁴.

Es posible detectar simultáneamente más de un fragmento de ADN del mismo genoma o de distintos genomas en el mismo tubo con la PCR-TR. También se puede cuantificar la concentración inicial de ADN (o ARN) diana en la muestra

añadiendo controles con concentraciones conocidas del segmento de ácido nucleico que se quiere detectar (curva estándar) en cada experimento. El ciclo en el que se empieza a detectar el aumento de fluorescencia se denomina punto de corte (Cp, de crossing point) o ciclo umbral (Ct, de threshold cycle) y es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN diana presente en la muestra. Con las concentraciones previamente conocidas de los controles y sus Ct correspondientes se dibuja una curva patrón. Interpolando en ella los valores de los Ct de cada muestra problema se puede inferir su concentración de ácido nucleico inicial.

1.1.3. Ventajas de la PCR en Tiempo Real

La primera gran ventaja de la PCR-TR es su rapidez, puesto que no se necesita ningún proceso adicional de detección. Otra ventaja es que al utilizar sistemas cerrados, el riesgo de contaminación disminuye de forma muy importante. Los sistemas de tiempo real permiten cuantificar la concentración inicial de ácido nucleico presente en las muestras de manera mucho más sencilla que los de tipo convencional lo cual se traduce en la identificación y cuantificación de los agentes infecciosos de interés clínico. Asimismo, la determinación de mutaciones puntuales que pueden estar relacionadas con resistencias a medicamentos antimicrobianos o con factores de virulencia, es mucho más fácil. Los equipos para PCR-TR tienen una capacidad muy elevada ya que en el mismo instrumento se pueden llevar a cabo ensayos cualitativos, cuantitativos, determinación de mutaciones, PCR múltiple, etc., mientras que para los procedimientos convencionales se requieren múltiples equipos.

Debido a sus indudables ventajas, como la facilidad de empleo, la mayor rapidez o el menor riesgo de contaminación, la PCR-TR, irá reemplazando la PCR convencional y se extenderá a un amplio abanico de aplicaciones microbiológicas³.

La mayoría de los estudios en virología solo se enfocaban a la detección de la presencia o no del virus en cuestión, con la PCR-TR, se pueden monitorear el

nivel específico de la actividad de los genes virales, es decir se puede evaluar como afecta la vía de entrada del virus en su replicación, la relación entre la expresión de los genes virales y los genes celulares, las diferencias en la actividad de las variedades del mismo virus, etc.

1.1.4. Virus Aviares

Algunos de los virus aviares más importantes en la avicultura mexicana son: influenza aviar (IA), enfermedad de Newcastle (EN) y bronquitis infecciosa (BI).

1.1.4.1. Influenza aviar

El virus de IA se distribuye mundialmente y se clasifica de acuerdo al tipo de hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) presente en su superficie. Actualmente se reconocen 16 variantes de HA y 9 de NA^{5,6,7,8}. Los virus de IA, también se clasifican en dos patotipos, basados en su virulencia en aves domésticas: influenza de baja patogenicidad (LPAI) e influenza de alta patogenicidad (HPAI)⁹. Entre los 16 subtipos de HA, el patotipo HPAI ha sido asociado con una pequeña proporción de los subtipos H5 y H7¹⁰. Las aves acuáticas, principalmente los patos y gansos son el reservorio natural de todos los subtipos de IA^{7,8,9}. Algunas cepas del virus de influenza aviar también tiene la capacidad de replicarse en aves domésticas, cerdos y humanos¹¹.

El virus de IA pertenece a la familia *Orthomyxoviridae* y al género *Influenzavirus A*. Dentro de las características de este virus se puede mencionar que el virión está envuelto, su tamaño es de 80-120 nanómetros de diámetro con una longitud de 200-300 nanómetros presentando una simetría helicoidal. El genoma del virus de IA es ARN de sentido negativo, de cadena simple y se divide

en ocho segmentos los cuales codifican para diversas proteínas. El genoma completo tiene un tamaño de 13600 pb.

Los métodos de rutina para detectar y realizar la caracterización del virus de influenza aviar incluyen aislamiento del virus en embrión de pollo, seguido de identificación por medio de inhibición de la hemaglutinación o la prueba de ELISA. El cultivo viral es muy sensible, pero el tiempo necesario, además de requerir partículas virales infecciosas, es muy demandante. Por otro lado la prueba de ELISA para los anticuerpos o el antígeno, es una prueba de especificidad limitada. Un acercamiento para una rápida identificación y detección de los virus de influenza aviar es la utilización de la transcriptasa reversa (RT) y la PCR, pero estas técnicas requieren de múltiples manipulaciones de la muestra, lo que eleva el riesgo de contaminación¹⁵.

La PCR-TR presenta elevada sensibilidad y es capaz de detectar todos los subtipos del virus de influenza aviar^{14,15,16}.

La región más conservada del genoma del virus de influenza aviar es el gen de la proteína M. Se han diseñado cebadores en base a la homología del gen de la matriz (segmento 7)¹⁷.

Además de diseñar iniciadores en el gen de la proteína M, para hacer la identificación del influenza virus, también se pueden diseñar iniciadores y sondas para identificar los genes de cada variante de HA y NA¹⁵.

1.1.4.2. Enfermedad de Newcastle

El primer reporte de la enfermedad de Newcastle en aves domésticas se realizó en 1926 y actualmente se reconoce en todo el mundo y se sabe que causa severas pérdidas en la producción de aves domésticas. La enfermedad de Newcastle es producida por el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) que es

un *Paramixovirus Aviar 1* (APMV-1). Aislamientos del virus de la enfermedad de Newcastle han sido caracterizados en base a su virulencia en pollos en tres patotipos, dependiendo de la severidad de la enfermedad. Lentogénicos son de baja virulencia y puede causar manifestaciones respiratorias y entéricas leves. Mesogénicos causan enfermedades respiratorias primarias. Velogénicos son aquellas cepas que causan alta mortalidad, estas se clasifican en neurotrópicas y vicerotrópicas basado en su manifestación patológica. La hemaglutinina y la neuraminidasa contribuyen a propagar al virus en el hospedero¹⁹, pero se sabe que la proteína de fusión es la que contribuye en mayor proporción a la virulencia de esta enfermedad^{18,20,21}.

El virus de la enfermedad de Newcastle se clasifica dentro de la subfamilia *Paramyxovirinae* dentro de la familia *Paramyxoviridae* y pertenece al género *Avulavirus*. Dentro de las características de este virus se puede mencionar que el virión tiene un diámetro de 150 nanómetros, su genoma que es ARN de cadena simple sentido negativo tiene un tamaño de aproximadamente 15 kb, el cual codifica para ocho proteínas incluyendo RNA polimerasa (L), proteína hemaglutinina-neuraminidasa (HN), proteína de fusión (F), proteína de matriz (M), fosfoproteína (P) y núcleo proteína (N). Tiene una nucleocápside con simetría helicoidal (13-18 nanómetros) y una envoltura lipídica derivada de la membrana celular.

El aislamiento viral en embrión de pollo seguido de la inhibición de la hemoaglutinación con anticuerpos específicos, representa la referencia estándar para la detección de los virus. Aunque el aislamiento viral es un método muy sensible y específico, este se lleva a cabo en varios días en un diagnóstico de rutina. Métodos más rápidos de detección y tipificación se basan en la transcriptasa reversa-PCR (RT-PCR), seguida de electroforesis en gel de agarosa; la secuenciación de los productos amplificados mediante RT-PCR y el análisis de la restricción de los productos de amplificación y el uso de sondas marcadas²¹.

La región más conservada del genoma de este virus es la proteína de la matriz (M)²¹.

1.1.4.3. Bronquitis infecciosa

La bronquitis infecciosa es una enfermedad altamente contagiosa del tracto respiratorio superior en los pollos^{22,23}. También puede afectar a los riñones y el aparato reproductivo. Es de gran importancia económica en la industria avícola debido a su alta morbilidad y pérdidas de la producción asociadas con la enfermedad. El agente etiológico es el virus de bronquitis infecciosa (IBV)²³.

Es importante la rápida diferenciación entre el IBV de agentes de otras enfermedades del tracto respiratorio superior como el virus de influenza aviar y de la enfermedad de Newcastle, los cuales son muy similares en la etapa inicial de la enfermedad^{23,24}.

El IBV tiene cuatro proteínas estructurales; nucleocapside que rodea al ARN viral, una glicoproteína de la membrana, una proteína de la envoltura y una glicoproteína (espícula) en la superficie de la membrana. Existen diferentes serotipos del virus, los cuales no presentan inmunidad cruzada^{23,24}.

El virus de bronquitis infecciosa se clasifica dentro de la familia *Coronaviridae* y dentro del género *Coronavirus*. Dentro de las características del virus de bronquitis infecciosa se pueden mencionar que el virón está envuelto, tiene un diámetro de 120 a 160 nanómetros, su simetría es helicoidal. Su genoma que es ARN de cadena simple sentido positivo no segmentado tiene un tamaño de aproximadamente 27 kb.

El diagnóstico actual para la bronquitis infecciosa incluye aislamiento del virus en embriones de pollo, cultivo de órgano traqueal, cultivo celular, inmunoensayo y ensayos moleculares para detectar el ARN viral^{23,24}. El

aislamiento del virus es considerado como la norma de referencia, sin embargo, es caro y requiere de mucho tiempo²⁴. Los inmunoensayos utilizan anticuerpos monoclonales específicos contra el virus de bronquitis infecciosa, al cual detectan de manera directa e indirecta, con anticuerpos fluorescentes y con ELISA. Aunque más rápidos y más simples que el aislamiento viral los inmunoensayos tienen poca especificidad y sensibilidad y ninguno detecta todas las cepas o tipos del virus de bronquitis infecciosa²⁴. Los ensayos moleculares para detectar al virus de bronquitis infecciosa son usados de manera común, ya que proveen alta sensibilidad y especificidad, en un corto tiempo²⁴. Cuando la RT-PCR es utilizada para amplificar el gen de la glicoproteína del IBV posteriormente se puede realizar RFLP (restriction fragment length polymorphism) o la secuenciación para identificar el tipo de virus^{23,24}.

La región del genoma del virus de bronquitis infecciosa más conservada es un fragmento de aproximadamente 150 pb localizado en la región 5'^{23,24}.

1.1.5. Justificación

Existe la necesidad de detectar de manera más rápida y eficiente las enfermedades virales aviares. La PCR-TR es una técnica de biología molecular que presenta grandes ventajas para realizar la detección de virus aviares, así como sus variantes, entre ellas se puede mencionar su rapidez, su alta especificidad, la posibilidad de cuantificar las partículas virales, de detectar más de un agente en el mismo tubo, entre otras.

En México la disponibilidad de sistemas comerciales para PCR-TR es escasa y costosa. Este trabajo explora la posibilidad de implementar sistemas estandarizados de PCR-TR para el diagnóstico de enfermedades virales veterinarias en el país, a partir de información del dominio público y reactivos de acceso comercial.

1.1.6. Hipótesis

Es posible desarrollar en México sistemas basados en PCR en tiempo real para el diagnóstico de enfermedades virales aviares los cuales serán económicos y eficientes.

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

Desarrollar sistemas y procedimientos estandarizados de detección y cuantificación mediante PCR-TR de virus aviares.

2.2. Objetivos Particulares

Definir la región genómica de cada virus para realizar la PCR-TR, (Detección de los blancos de amplificación).

Obtención de las muestras virales. Obtención de líquidos alantoideos titulados de los virus de influenza aviar, enfermedad de Newcastle y bronquitis infecciosa.

Generar controles para la cuantificación de los productos de amplificación (Clonación de blancos de amplificación).

Desarrollar protocolos estandarizados para el proceso, amplificación y cuantificación de las muestras por PCR-TR.

Establecer los límites de sensibilidad de los ensayos de PCR-TR.

Establecer los niveles de reproducibilidad de los ensayos.

Detección de más de un virus en un solo tubo (PCR-TR múltiple).

Definir las condiciones de transcripción reversa y PCR-TR en un solo paso (RT-PCR-TR).

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Oligonucleótidos

A partir de la región más conservada del genoma de cada virus se sintetizaron iniciadores para amplificar y clonar este fragmento, con el fin de utilizarlo como control de amplificación en la reacción de PCR-TR. También se sintetizaron iniciadores y sondas TaqMan, para amplificar, detectar y cuantificar mediante PCR-TR el segmento más conservado de cada virus.

3.1.1. Influenza

Se diseñaron y sintetizaron iniciadores (cuadro 3.1.1.1) para amplificar un fragmento de 779 pb del gen de la proteína M del virus de influenza aviar mediante PCR, a partir de la secuencia de dicho fragmento (número de acceso CY005832) obtenida del GenBank²⁶.

Cuadro 3.1.1.1. Iniciadores para la amplificación de un fragmento de 779 pb del gen de la proteína M de influenza aviar por PCR. Se muestra el nombre, la secuencia, el tamaño y la posición de los iniciadores utilizados para amplificar un fragmento de 779 pb del gen de la proteína M del virus de influenza aviar mediante PCR.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Tamaño	Posición
IAMBamF	ATTGAAAGATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGT	36 pb	16-56
IAMBamR	GCAAATACAGCGATTCAAGTGATACTCTCGTT	32 pb	763-797

De igual forma, se sintetizaron iniciadores, así como una sonda TaqMan (cuadro 3.1.1.2), los cuales se emplearon para amplificar y detectar mediante PCR-TR un fragmento de 101 pb localizado dentro del gen de la proteína M del virus de influenza aviar¹⁵.

Cuadro 3.1.1.2. Oligonucleótidos para detectar el virus de influenza aviar mediante PCR-TR. Se muestra el nombre, la secuencia, el tamaño y la posición de los iniciadores utilizados para amplificar y detectar un fragmento de 101 pb del gen de la proteína M del virus de influenza aviar mediante PCR-TR¹⁵.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Tamaño	Posición
M + 25	AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG	24 pb	24-54
M – 124	TGC AAA AAC ATC TTC AAG TCT CTG	24 pb	101-131
M + 64	FAM-TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA-TAMRA	20 pb	74-99

3.1.2. Enfermedad de Newcastle

Para identificar y cuantificar el virus de la enfermedad de Newcastle mediante PCR-TR, se sintetizaron iniciadores, así como una sonda TaqMan (cuadro 3.1.2.1) que amplifican y detectan un fragmento de 121 pb localizado dentro del gen de la proteína M del virus de la enfermedad de Newcastle²¹.

Cuadro 3.1.2.1. Oligonucleótidos para detectar el virus de la enfermedad de Newcastle mediante PCR-TR. Se muestra el nombre, la secuencia, el tamaño y la posición de los iniciadores utilizados para amplificar y detectar un fragmento de 121 pb del gen de la proteína M del virus de la enfermedad de Newcastle mediante PCR-TR²¹.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Tamaño	Posición
M+4100	5'-AGTGATGTGCTCGGACCTTC-3'	20 pb	811-830
M-4220	5'-CCTGAGGAGAGGCATTTGCTA-3'	21 pb	911-931
M+4169	5'-[HEX]TTCTCTAGCAGTGGGACAGCCTGC[BHQ1]-3'	24 pb	879-903

3.1.3. Bronquitis infecciosa

Se sintetizaron iniciadores, así como una sonda TaqMan (cuadro 3.1.3.1) los cuales son utilizados para amplificar y detectar mediante PCR-TR un fragmento de 143 pb localizado en la región 5' del genoma del virus de bronquitis infecciosa²³.

Cuadro 3.1.3.1. Oligonucleótidos para detectar el virus de bronquitis infecciosa mediante PCR-TR. Se muestra el nombre, la secuencia, el tamaño y la posición de los iniciadores utilizados para amplificar y detectar un fragmento de la región 5' del genoma del virus de bronquitis infecciosa mediante PCR-TR²³.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Tamaño	Posición
IBV5'GU391	5'-GCTTTTGAGCCTAGCGTT-3'	18 pb	391-408
IBV5'GL533	5'-GCCATGTTGTCACTGTCTATTG-3'	22 pb	533-512
IBV5'G probe	5'-Cy5-CACCACCAGAACCTGTACCTC-BHQ2-3'	22 pb	494-473

3.2. Obtención de muestras

A partir de una colección de virus aviares del Departamento de Producción Animal: Aves (DPAA), de la FMVZ, UNAM, se obtuvieron muestras de líquidos alantoideos de los virus de influenza aviar, de la enfermedad de Newcastle y de bronquitis infecciosa. El virus de bronquitis Infecciosa aviar había sido previamente titulado. En el caso de los virus de influenza aviar y de la enfermedad de Newcastle los títulos en dosis infectante embrión de pollo 50% fueron obtenidos como se ejemplifica en el anexo 1. En el cuadro 3.2.1 se muestran los títulos virales obtenidos.

Cuadro 3.2.1. Títulos virales de los aislados de influenza aviar, la enfermedad de Newcastle y bronquitis infecciosa. Se muestra el nombre de cada uno de los virus así como su título.

Virus	Título DIEP ₅₀ *
Virus de influenza aviar (aislado X del Departamento de Producción Animal: Aves)	1 X 10 ^{7.5} /ml
Virus de bronquitis infecciosa (cepa Massachusetts)	1 X 10 ^{7.6} /ml
Virus de la enfermedad de Newcastle (cepa La Sota)	1 X 10 ^{8.7} /ml

*DIEP50: dosis infectante embrión de pollo 50%

3.3. Clonación de los controles de amplificación

3.3.1. Amplificación de segmentos control

A partir de cada muestra titulada de líquido alantoideo se purificó el ARN de cada virus (anexo 2). Mediante RT (transcriptasa reversa, anexo 3), se obtuvo el cDNA del segmento diagnóstico de cada virus. Del cDNA de los virus antes mencionados se realizó una PCR (anexo 4) para amplificar el segmento diagnóstico del genoma para cada virus, empleando los iniciadores descritos en los cuadros 3.1.1.1, 3.1.2.1 y 3.1.3.1.

3.3.2. Clonación de los segmentos diagnósticos del los virus de IA, EN y BI

Los fragmentos diagnósticos amplificados de cada virus se purificaron mediante perlas de sílica (anexo 5), recortando las bandas de ADN después de ser sometidos a electroforesis en gel de agarosa.

El ADN purificado se ligó al respectivo vector de clonación comercial (anexo 6), el cual se utilizó para transformar bacterias de *E. coli* (anexo 7). Las colonias

transformantes se evaluaron para identificar aquellas que contenían plásmidos recombinantes con los segmentos diagnósticos. Estas colonias se suspenden en 50µl de agua, se calientan a 94°C por 10 min. De allí se toma una alícuota y se realiza PCR empleando los iniciadores específicos para cada virus.

3.3.3. Amplificación y purificación del ADN de los plásmidos controles

Las bacterias recombinantes se crecieron en 2.5 litros de medio LB-ampicilina y el ADN de cada plásmido se purificó como se describe en el anexo 8.

3.4. Cuantificación de los plásmidos

El ADN de cada plásmido purificado se cuantificó (anexo 9), con el objetivo de utilizarlo como control para la cuantificación de las partículas virales en las reacciones de PCR-TR.

3.5. Condiciones de PCR-TR

Se empleó el ADN de los plásmidos recombinantes (los tres plásmidos que contienen los tres fragmentos diagnósticos respectivamente) para realizar experimentos y determinar las condiciones óptimas de amplificación y cuantificación mediante PCR-TR. Se evaluaron diferentes concentraciones de iniciadores y de sonda. Se probaron diferentes concentraciones de MgCl₂, transcriptasa reversa, ADN polimerasa Taq, así como la inclusión de aditivos como DMSO y formamida.

Se encontró que los 3 segmentos virales pueden ser amplificados en las mismas condiciones para la PCR en tiempo real. En el cuadro 3.5.1 se presentan

las concentraciones de los reactivos empleadas en las reacciones de PCR-TR. En el cuadro 3.5.2 se muestran las condiciones de ciclado de temperaturas.

Cuadro 3.5.1. Condiciones de cada reactivo para la PCR-TR. Se muestran los componentes, las concentraciones presentes en cada stock, las concentraciones finales en la reacción y el volumen en microlitros de cada componente para cada reacción.

Reactivo	Stock	Concentración final	Una reacción
H ₂ O	cbp	20 µl	1.3 µl
Buffer	10 x	1 x	2 µl
d´NTP´s	2 mM	0.4 mM	4 µl
MgCl ₂	30 mM	2 mM	1.3 µl
Taq Pol	5 unidades/µl	1 unidad/rx	0.2 µl
Iniciadores	10 µM	0.5 µM	1 µl
Sonda	10 µM	0.1 µM	0.2 µl
ADN	---	---	10 µl

Cuadro 3.5.2. Condiciones de temperatura para la PCR-TR. Se observa la temperatura y el tiempo en cada paso.

Temperatura	Tiempo
95°C	10 minutos
95°C	10 segundos
60°C	45 segundos

3.6. Sensibilidad

Con la intención de identificar el menor número de moléculas que pueden ser amplificadas y cuantificadas por PCR-TR, se realizaron diluciones decuples seriadas del ADN de cada plásmido (anexo 10).

3.7. Cuantificación del número de copias virales y reproducibilidad de los ensayos

Se realizó la purificación de ARN de cada virus, el ARN purificado se re suspendió en 20 µl de agua DEPC, se tomaron 7 µl para realizar la RT, la cual se realizó en 20 µl, una vez sintetizado el cDNA se realizaron diluciones decuples seriadas (1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000). De cada dilución se tomaron 10 ul por triplicado para realizar la cuantificación, en cada experimento, la construcción de la curva estándar se realizó mediante la inclusión de un volumen de 10 ul de cada dilución décuple seriada realizada a partir de la concentración inicial de cada plásmido (seis puntos por cada curva por duplicado, en un rango de 10 ng/reacción a 0.0001 ng/reacción). Se realizaron tres experimentos independientes de PCR-TR para cuantificar cada virus con la finalidad de observar la reproducibilidad (anexo 11). Los valores obtenidos de cada experimento de cuantificación se utilizaron para calcular el coeficiente de correlación intraclase (anexo 11).

3.8. Comparación de títulos virales

Se compararon los títulos virales de cada virus obtenidos por embrión de pollo y por PCR-TR.

3.9. Detección de más de un virus en un tubo

Al realizar la detección y cuantificación de los 3 virus aviares en un mismo ensayo, es posible que haya interferencia entre los diferentes reactivos que se incluyen en la reacción, es decir el ADN de los tres plásmidos (pIAMT, pJETENM Y pJETBI5') y los tres juegos de oligonucleótidos utilizados para amplificar los fragmentos de 101 pb (M + 25, M – 124, M + 64 (IA)), 121 pb (M+4100, M-4220, M+4169 (EN)) y 143 pb (IBV5'GU391, IBV5'GL533, BV5'G probe (BI)), es por ello que se realizaron experimentos para evaluar la posible interferencia en la amplificación de los segmentos diagnósticos mediante PCR-TR cuando se incluye más de un plásmido y más de un juego de oligonucleótidos en el mismo tubo.

Para esto se realizaron una serie de experimentos en donde:

- a) Se amplificaron de forma independiente diferentes cantidades de cada plásmido (6 diluciones decuples seriadas por duplicado en un rango de 10 ng/reacción a 0.0001 ng/reacción), para construir una curva de calibración. Así mismo se realizaron estas amplificaciones pero en presencia de los 3 plásmidos en cada dilución. Se empleó solo un juego de oligonucleótidos (iniciadores y sonda), para cada amplificación.
- b) Se amplificó cada uno de los plásmidos de forma independiente, diferentes cantidades de cada plásmido (6 diluciones decuples seriadas por duplicado en un rango de 10 ng/reacción a 0.0001 ng/reacción), para construir una curva de calibración empleando su propio juego de iniciadores y sonda. Esto se comparó con amplificaciones similares pero en presencia de 3 juegos de oligonucleótidos (iniciadores y sonda).
- c) Finalmente se amplificaron simultáneamente diferentes cantidades de los 3 plásmidos (6 diluciones decuples seriadas por duplicado en un rango de 10 ng/reacción a 0.0001 ng/reacción), para construir para cada uno de ellos una curva de calibración, incluyendo en cada reacción los 3 juegos de

oligonucleótidos (iniciadores y sonda). Los resultados de amplificación se compararon con la amplificación independiente de cada serie de diluciones para cada plásmido.

En los cuadros 3.9.1 al 3.9.3 se muestran los experimentos realizados en a. En los cuadros 3.9.4 al 3.9.6 se muestran los experimentos realizados en b. En los cuadros 3.9.7 se muestran los experimentos realizados en c.

Cuadro 3.9.1. Construcción de la curva estándar utilizando los plásmidos pIAMT, pJETENM y pJETBI5' y los oligonucleótidos M + 25, M – 124 y M + 64; M+4100, M-4220 y M+4169; IBV5'GU391, IBV5'GL533 y BV5'G probe.

Plásmidos	Oligonucleótidos
pIAMT, pJETENM Y pJETBI5'	M + 25, M – 124 y M + 64
pIAMT	M + 25, M – 124 y M + 64

Cuadro 3.9.2. Construcción de la curva estándar para la evaluación de la detección del fragmento de 121 pb. Se indica el nombre de los plásmidos y el nombre de los oligonucleótidos.

Plásmidos	Oligonucleótidos
pIAMT,	M+4100, M-4220 y M+4169
pJETENM Y pJETBI5'	
pJETENM	M+4100, M-4220 y M+4169

Cuadro 3.9.3. Construcción de la curva estándar para la evaluación de la detección del fragmento de 143 pb. Se indica el nombre de los plásmidos, el nombre de los oligonucleótidos.

Plásmidos	Oligonucleótidos
pIAMT, pJETENM Y pJETBI5'	IBV5'GU391, IBV5'GL533 y BV5'G probe
pJETBI5'	IBV5'GU391, IBV5'GL533 y BV5'G probe

Cuadro 3.9.4. Construcción de la curva estándar para la evaluación de la detección del fragmento de 101 pb. Se indica el nombre de los plásmidos, el nombre de los oligonucleótidos.

Plásmidos	Oligonucleótidos
pIAMT	M + 25, M – 124 y M + 64; M+4100, M-4220 y M+4169; IBV5'GU391, IBV5'GL533 y BV5'G probe
pIAMT	M + 25, M – 124 y M + 64

Cuadro 3.9.5. Construcción de la curva estándar para la evaluación de la detección del fragmento de 121 pb. Se indica el nombre de los plásmidos, el nombre de los oligonucleótidos.

Plásmidos	Oligonucleótidos
pJETENM	M + 25, M – 124 y M + 64; M+4100, M-4220 y M+4169; IBV5'GU391, IBV5'GL533 y BV5'G probe
pJETENM	M+4100, M-4220 y M+4169

Cuadro 3.9.6. Construcción de la curva estándar para la evaluación de la detección del fragmento de 143 pb. Se indica el nombre de los plásmidos, el nombre de los oligonucleótidos.

Plásmidos	Oligonucleótidos
pJETBI5'	M + 25, M – 124 y M + 64; M+4100, M-4220 y M+4169; IBV5'GU391, IBV5'GL533 y BV5'G probe
pJETBI5'	IBV5'GU391, IBV5'GL533 y BV5'G probe

Cuadro 3.9.7. Construcción de la curva estándar para la evaluación de la detección del fragmento de 101 pb 121 pb y 143 pb. Se indica el nombre de los plásmidos, el nombre de los oligonucleótidos.

Plásmidos	Oligonucleótidos
pIAMT, pJETENM Y pJETBI5'	M + 25, M – 124 y M + 64; M+4100, M-4220 y M+4169; IBV5'GU391, IBV5'GL533 y BV5'G probe
pIAMT	M + 25, M – 124 y M + 64
pJETENM	M+4100, M-4220 y M+4169
pJETBI5'	IBV5'GU391, IBV5'GL533 y BV5'G probe

3.10. Transcripción reversa y PCR-TR en un solo paso múltiple.

Se definieron las condiciones para realizar la transcripción reversa y PCR-TR múltiple en un solo tubo a partir de RNA purificado. A partir de 100 y 10 µl de líquido alantoideo se purificó el RNA de los virus de IA, EN y BI. El ARN purificado se resuspendió en 20 µl de agua DEPC, a partir de este volumen se tomó una

alícuota de 7.5 µl para realizar la TR-PCR-TR, con el objetivo de amplificar y detectar cada uno de los tres virus. También se realizaron curvas estándar de amplificación para cuantificar cada virus, para esto se colocaron diversas cantidades de cada plásmido (pIAMT= 3.6 ng, 0.36 ng, 0.036 ng, 0.0036 ng y 0.00036 ng; pJETENM= 15.35 ng, 1.535 ng, 0.1535 ng, 0.01535 ng y 0.001535 ng; pJETBI5'= 31.43 ng, 3.143 ng, 0.3143 ng, 0.03143 ng y 0.003143 ng). Estas condiciones se evaluaron experimentalmente y se ajustaron algunos ingredientes. En el cuadro 3.10.1 se muestran las condiciones definitivas de los ingredientes de la reacción y las condiciones de los ciclos de amplificación en el termociclador.

Cuadro 3.10.1. Se muestran los ingredientes de la reacción, su concentración, la concentración final en la reacción y la cantidad requerida de cada reactivo para una reacción.

Reactivo	Stock	Concentración final	Una reacción (volumen de 20µl)
H ₂ O	cbp	20 µl	1.1 µl
Buffer TaqPolimerasa	10 x	1 x	2 µl
d´NTP´s	2 mM	0.4 mM	4 µl
MgCl ₂	30 mM	3 mM	2 µl
Taq Pol	5 unidades/µl	1 unidad	0.2 µl
Iniciadores	10 µM	0.2 µM	0.4 µl
Sonda	10 µM	0.1 µM	0.2 µl
RNAsa out	40 unidades/ µl	4 unidades	0.1 µl
RT	200 unidades/µl	20 unidades	0.1 µl
ARN	---	---	Hasta 10 µl

Las condiciones de amplificación fueron: Un paso a 42°C por 30 min seguido por un paso a 95°C por 10 minutos. Posteriormente 40 ciclos de 95°C por 10 segundos y 60°C por 45 segundos.

IV. RESULTADOS

4.1. Clonación de los controles de amplificación

Con el fin de obtener controles de amplificación, se purificó el ácido nucleico a partir de una muestra de líquido alantoideo de cada virus, mediante transcriptasa reversa se obtuvo el cDNA a partir del ARN purificado y se amplificaron por PCR los segmentos genéticos para cada virus que son los blancos de amplificación en la reacción de PCR-TR.

4.1.1. Amplificación de segmentos control

Utilizando los iniciadores del cuadro 3.1.1.1 se amplificó un fragmento de 779 pb del gen de la proteína M del virus de influenza aviar mediante PCR punto final (anexo 4) figura 4.1.1.1.

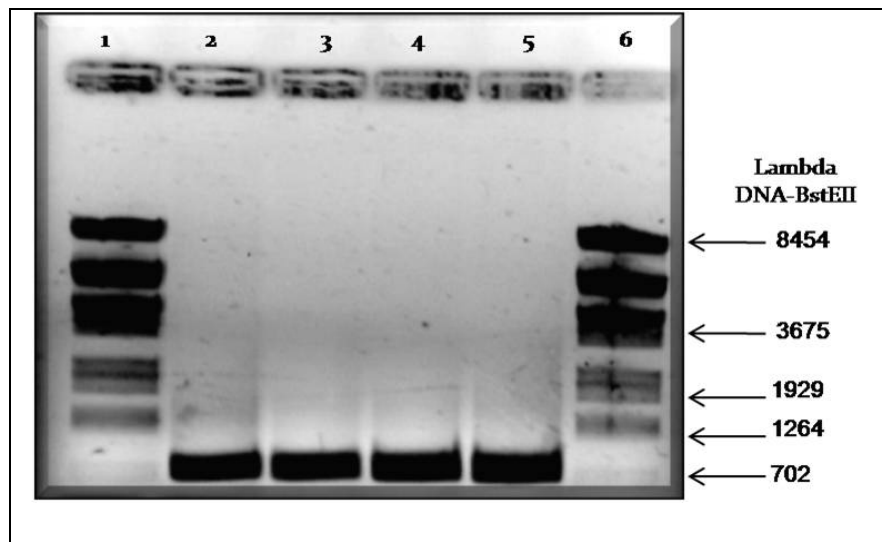


Figura 4.1.1.1. Amplificación del fragmento de 779 pb del gen de la proteína M del virus de influenza aviar. Gel de agarosa al 1%, se observa el marcador de peso molecular (ADN Lambda digerido con BstEII) en los carriles 1 y 6, también se observa en los carriles 2 al 5 un fragmento de 779 pb amplificado mediante PCR.

Utilizando los iniciadores M+4100 y M-4220 se amplificó un fragmento de 121 pb del gen de la proteína M del virus de la enfermedad de Newcastle mediante PCR (anexo 4) figura 4.1.1.2.

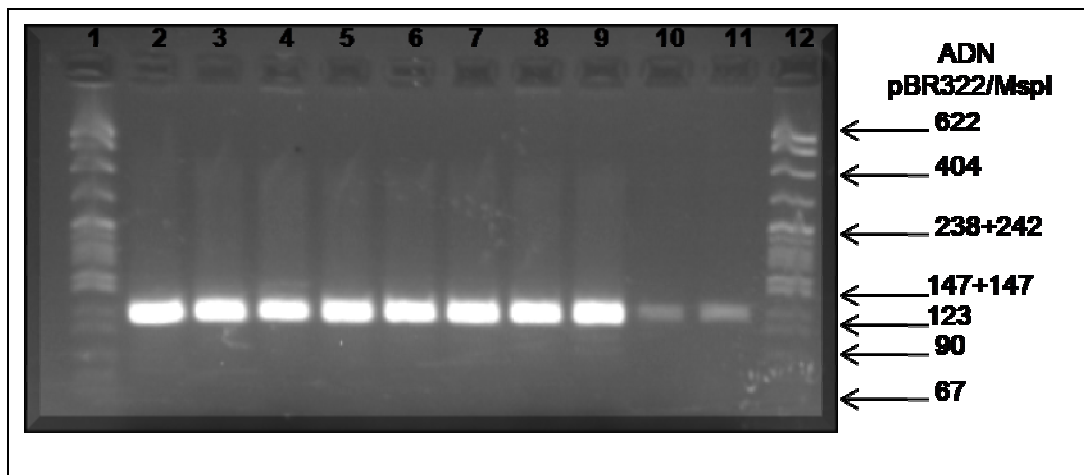


Figura 4.1.1.2. Amplificación de un fragmento de 121 pb del gen de la proteína M del virus de la enfermedad de Newcastle. Gel de agarosa al 3%, se observa el marcador de peso molecular en los carriles 1 y 12, también se observa en los carriles 2 al 11 un fragmento de 121 pb amplificado mediante PCR.

Para amplificar un fragmento de 143 pb de la región 5' del genoma del virus de bronquitis infecciosa mediante PCR se emplearon los iniciadores IBV5'GU391 y IBV5'GL533 (anexo 4), figura 4.1.1.3.

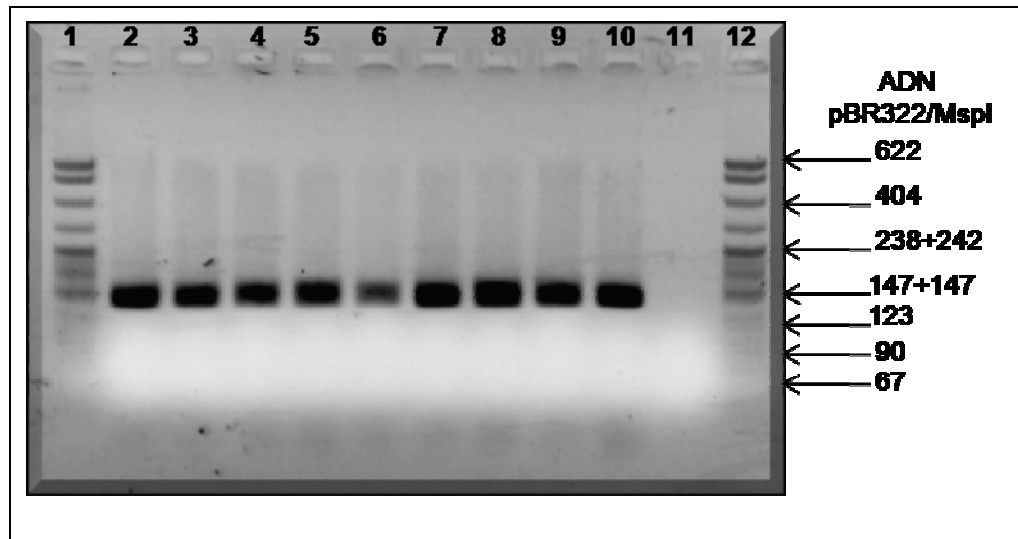


Figura 4.1.1.3. Amplificación de un fragmento de 143 pb de la región 5' del genoma del virus de bronquitis infecciosa. Gel de agarosa al 3%, se observa el marcador de peso molecular en los carriles 1 y 12, también se observa en los carriles 2 al 10 un fragmento de 143 pb amplificado mediante PCR y el control negativo (sin incluir cDNA) en el carril 11.

4.1.2. Clonación de los segmentos diagnósticos

Posteriormente a la amplificación de los fragmentos generados de cada uno de los virus se purificó mediante perlas de sílica (ver anexo 5).

Con el fin de contar con controles de amplificación y cuantificar los virus estudiados, se clonó el fragmento de 779 pb del gen de la proteína M del virus de influenza aviar obteniendo el plásmido pIAMT; el fragmento de 121 pb del gen de la proteína M del virus de la enfermedad de Newcastle, obteniendo el plásmido pJETENM y el fragmento de 143 pb localizado en el extremo 5' del genoma del virus de bronquitis infecciosa, obteniendo el plásmido pJETBI5', (anexo 6). Posteriormente el plásmido pIAMT se utilizó para transformar a la cepa DH10b de *E. coli* y los plásmidos pJETENM y pJETBI5' se utilizaron para transformar a la cepa DH5α de *E. coli*, ver anexo 7.

4.1.3. Purificación de los plásmidos

Con el fin de obtener cantidades suficientes de los plásmidos controles, estos fueron amplificados en cultivos bacterianos en un volumen de 2.5 litros, y se purificó el ADN empleando un kit comercial (Qiagen, QIAfilter Plasmid Midi Kit Cat #: 12243). En las figuras 4.1.3.1, 4.1.3.2 y 4.1.3.3, se muestran los plásmidos purificados (anexo 8).

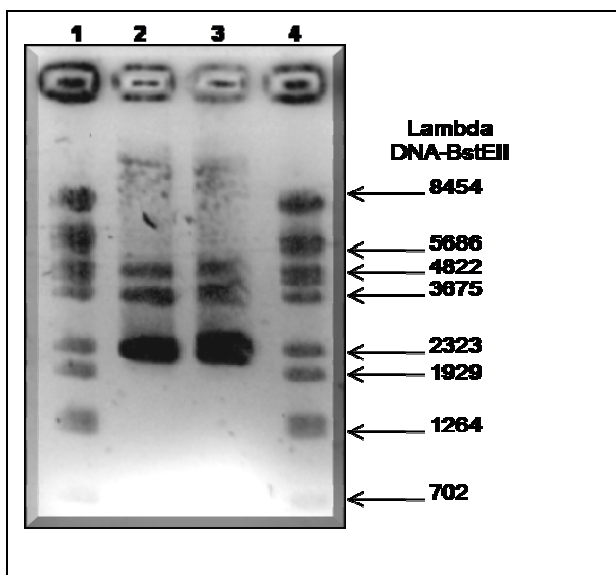


Figura 4.1.3.1. Purificación del plásmido pIAMT. Gel de agarosa al 1% donde se muestra el marcador de peso molecular (ADN Lambda digerido con BstEII) carril 3, también se observa el plásmido pIAMT purificado, carriles 1 y 2.

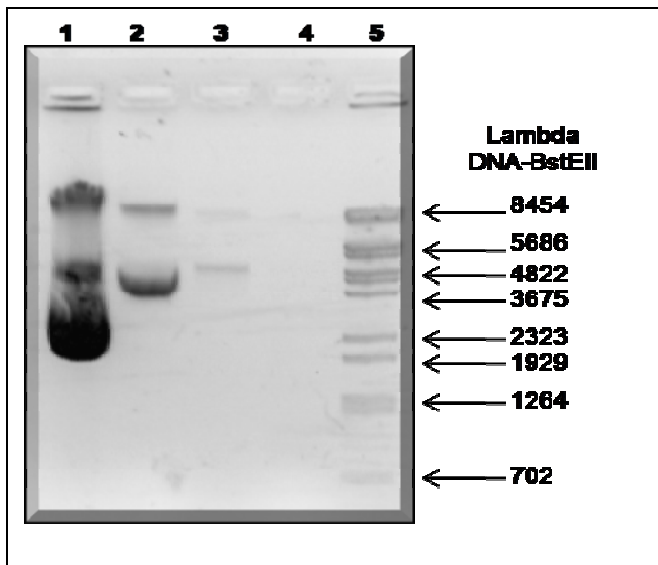


Figura 4.1.3.2. Purificación del plásmido pJETENM. Gel de agarosa al 1% donde se muestra el marcador de peso molecular (ADN Lambda digerido con BstEII) carril 5, también se observa el plásmido pJETENM purificado carril 1 (sin diluir), carril 2 (dilución 1:10), carril 3 (dilución 1:100) carril 4 (dilución 1:1000).

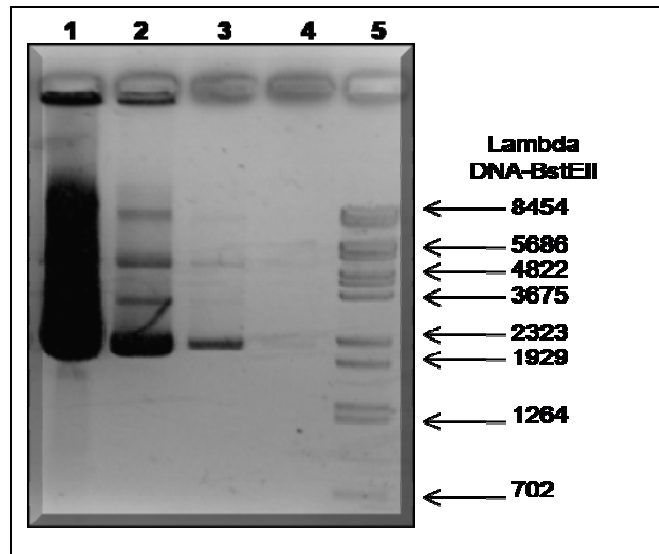


Figura 4.1.3.3. Purificación del plásmido pJETBI5'. Gel de agarosa al 1% donde se muestra el marcador de peso molecular (ADN Lambda digerido con BstEII) carril 5, también se observa el plásmido pJETBI5' purificado carril 1 (sin diluir), carril 2 (dilución 1:10), carril 3 (dilución 1:100) carril 4 (dilución 1:1000).

4.2. Cuantificación de los plásmidos

Los plásmidos pIAMT, pJETENM y pJETBI5' se cuantificaron en el termociclador el Rotor-Gene 6000, en relación a una curva de calibración empleando un ADN estándar y utilizando el colorante PicoGreen. Para cada ADN se realizaron primero 4 diluciones decuples seriadas para encontrar la dilución adecuada para trabajar con la curva de calibración construida. Después, se evaluaron 4 diferentes volúmenes de dicha dilución (ver anexo 9). En el Cuadro 4.2.1 se muestra la concentración de ADN obtenida para cada plásmido. En el cuadro 4.2.2 se indica el tamaño del inserto clonado en cada plásmido, su tamaño en pb, su peso molecular y el número de moléculas que contiene cada ng.

Cuadro 4.2.1. Cuantificación del ADN de los plásmidos purificados (pIAMT, pJETENM y pJETBI5'). Se muestra la cantidad y la concentración del ADN de los plásmidos obtenida utilizando PicoGreen en el Rotor-Gene 6000.

Plásmido	Concentración ng/ μ l	Cantidad de ADN obtenido
pIAMT	144	72 μ g
pJETENM	614	307 μ g
pJETBI5'	1257	628 μ g

Cuadro 4.2.2. Muestra el tamaño del inserto clonado en cada plásmido, su tamaño, su peso molecular y el número de moléculas por ng.

Nombre Plásmido	Tamaño inserto (pb)	Tamaño Plásmido (pb)	Tamaño total (pb)	Peso Molecular (daltones)	No Copias/ng
pIAMT	779	2886	3665	2382250	2.53×10^8
pJETENM	121	2974	3095	2011750	2.99×10^8
pJETBI5'	143	2974	3117	2026050	2.97×10^8

En las Figuras 4.2.1, 4.2.2 y 4.2.3 se muestran la curva de calibración construidas a partir del ADN estándar, los valores de R^2 y los diferentes volúmenes de las diluciones del ADN de cada uno de los plásmidos.

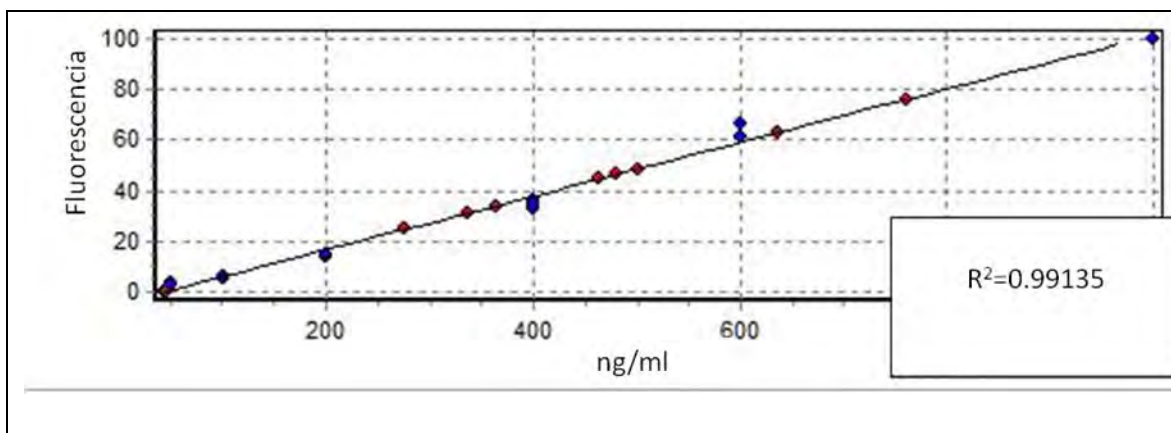


Figura 4.2.1. Curva estándar de la cuantificación de ADN del plásmido pIAMT. Se muestra la R^2 (0.99135) entre la cantidad de ADN (eje de las X) y la fluorescencia detectada (eje de las Y) de la curva estándar (puntos azules) y las diluciones del plásmido pIAMT (puntos rojos).

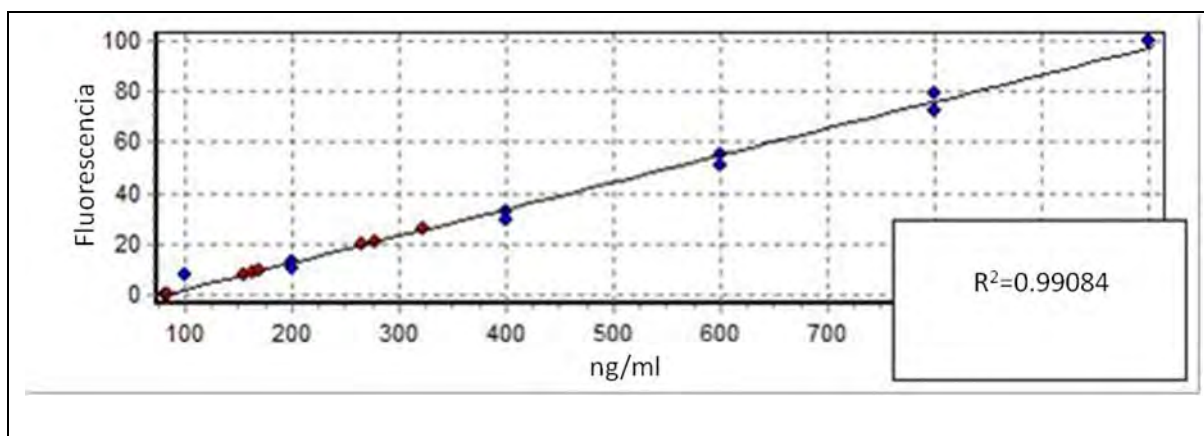


Figura 4.2.2. Curva estándar de la cuantificación de pJETENM. Se muestra la R^2 (0.99084) entre la cantidad de ADN (eje de las X) y la fluorescencia detectada (eje de las Y) de la curva estándar (puntos azules) y las diluciones del plásmido pJETENM (puntos rojos).

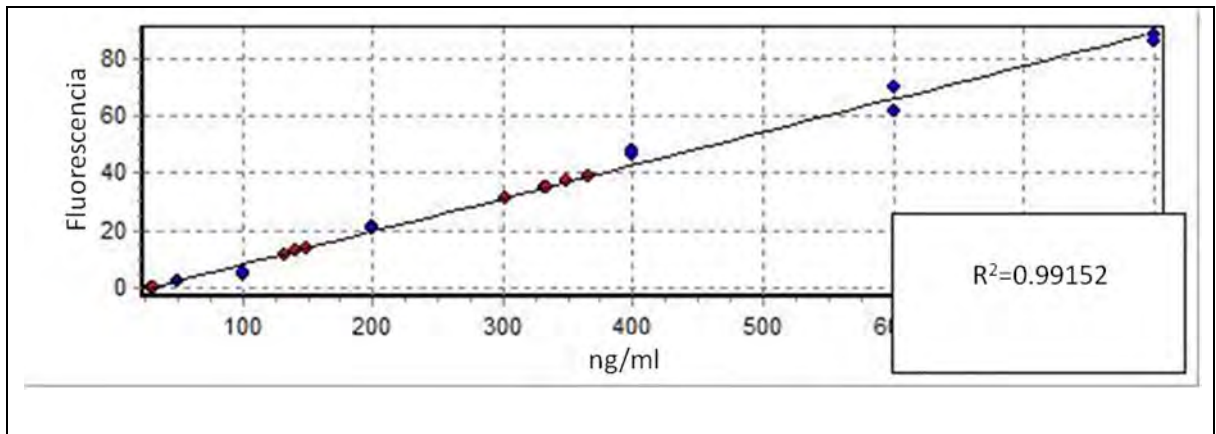


Figura 4.2.3. Curva estándar de la cuantificación de PJETBI5'. Se muestra la R^2 (0.99152) entre la cantidad de ADN (eje de las X) y la fluorescencia detectada (eje de las Y) de la curva estándar (puntos azules) y las diluciones del plásmido PJETBI5' (puntos rojos).

4.3. Sensibilidad

Para identificar el número mínimo de moléculas detectables mediante amplificación por PCR-TR, se sometieron a amplificación cantidades conocidas del ADN de cada plásmido efectuando 10 diluciones decuples seriadas (ver anexo 10).

Las cantidades evaluadas fueron para pIAMT de 144 ng ($1 \times 10^{10.5}$ copias) hasta 0.144 fg ($1 \times 10^{1.5}$ copias), para pJETENM de 61.4 ng ($1 \times 10^{10.26}$ copias) hasta 0.061 fg ($1 \times 10^{1.2}$ copias) y para pJETBI5' de 125ng ($1 \times 10^{10.5}$ copias) hasta 0.125 fg ($1 \times 10^{1.5}$ copias).

En las figuras 4.3.1, 4.3.2 y 4.3.3 se muestra que en las diluciones por debajo de 1×10^4 copias de cada plásmido, el grado de fluorescencia es similar a la encontrada en el control negativo (sin ADN). Este punto se considera como el límite de detección de las condiciones de PCR-TR de los ensayos. Este valor de 1×10^4 copias representa aproximadamente 100fg.

Notamos que cuando se incluye en los cálculos de la curva de calibración el ADN con valores por debajo de 1×10^4 copias (por debajo de el límite de

detección) el valor de R^2 se reduce. Pero si estos valores no son considerados la R^2 mantiene valores adecuados de confiabilidad.

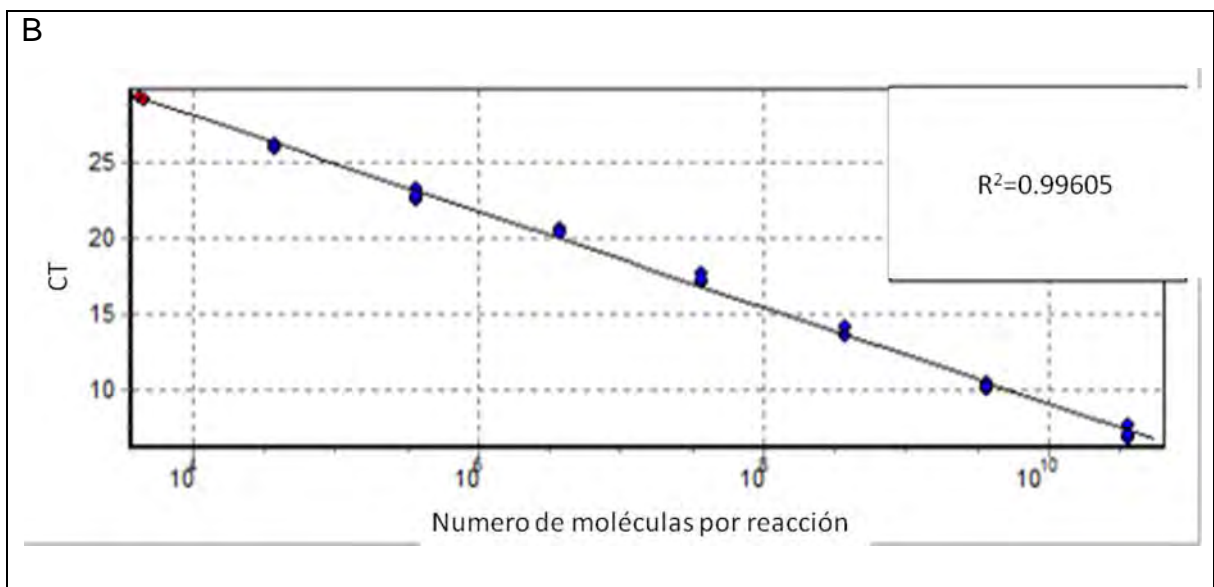
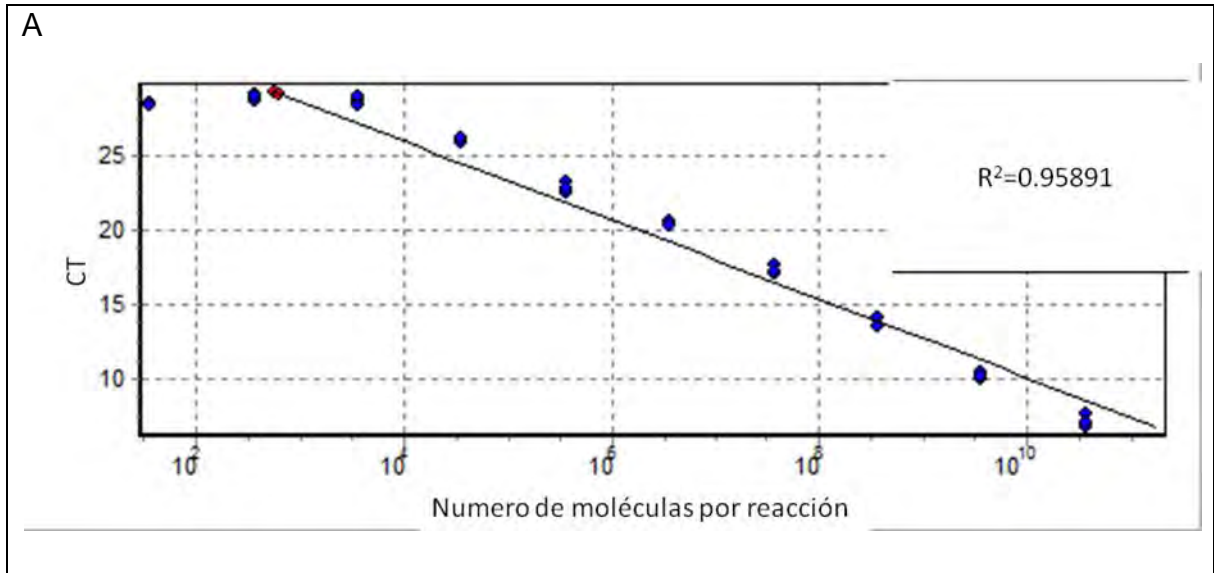


Figura 4.3.1. Comportamiento de las señales de amplificación de diferentes cantidades de ADN del plásmido pIAMT mediante PCR-TR. En A se observa el número de moléculas del plásmido pIAMT (eje de las X) y la fluorescencia detectada (eje de las Y) mediante PCR-TR, se encuentra que la R^2 es 0.9589. Debido a que los puntos con mayor dilución la fluorescencia es semejante al cero. Si estos últimos tres puntos son eliminados (B) la R^2 es 0.9960.

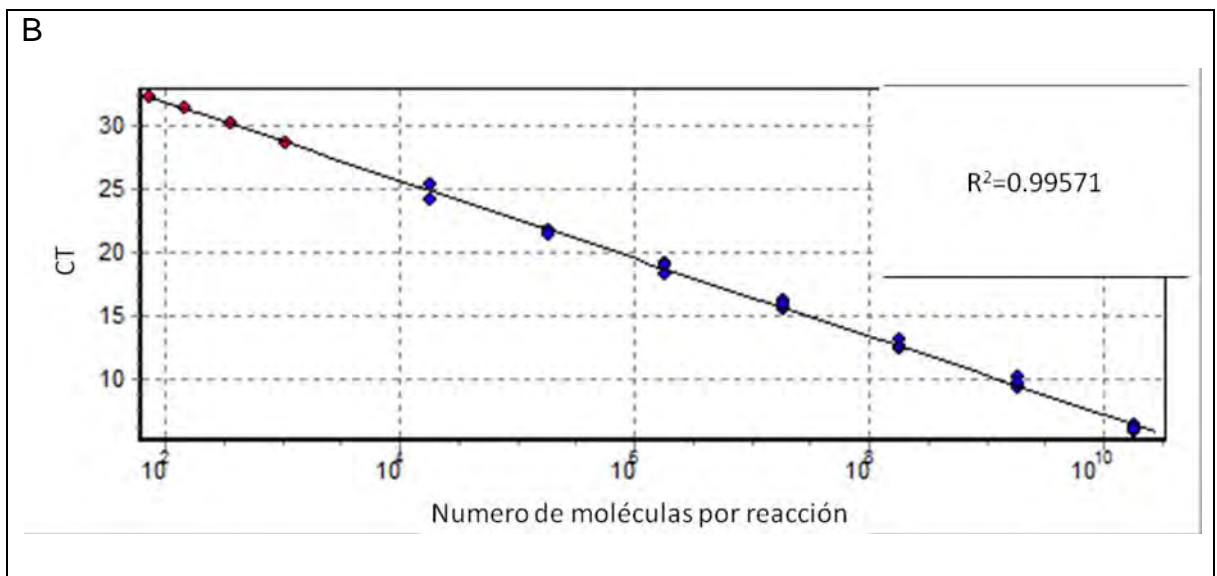
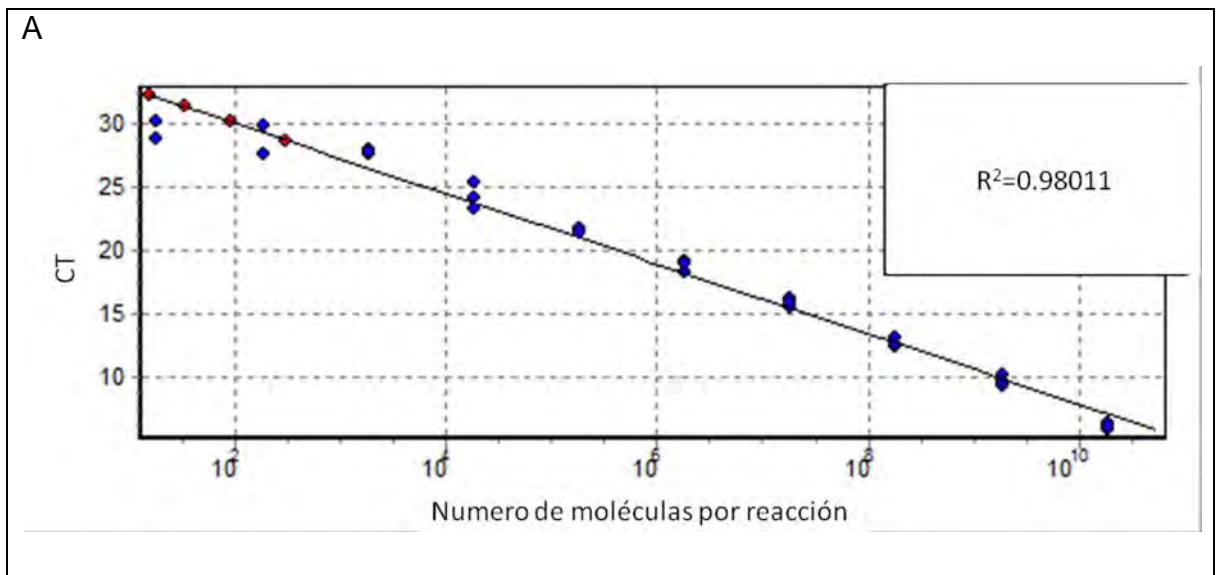


Figura .3.2. Comportamiento de las señales de amplificación de diferentes cantidades de ADN del plásmido pJETENM mediante PCR-TR. En A se observa el número de moléculas del plásmido pJETENM (eje de las X) y la fluorescencia detectada (eje de las Y) mediante PCR-TR, se encuentra que la R^2 es 0.9801. Debido a que los puntos con mayor dilución la fluorescencia es semejante al cero. Si estos últimos tres puntos son eliminados (B) la R^2 es 0.9957.

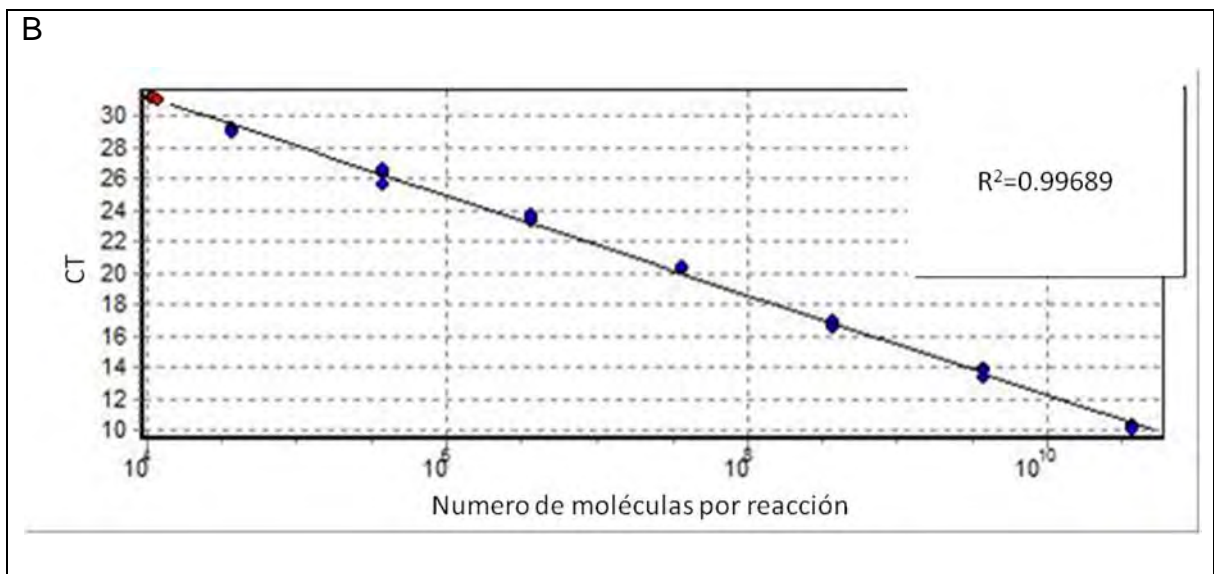
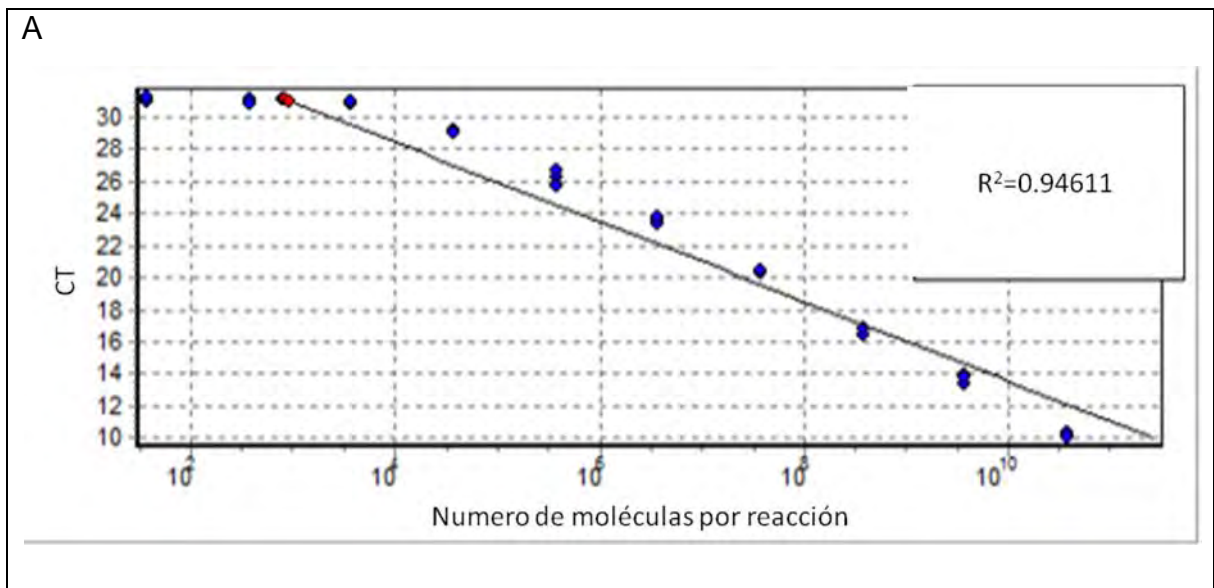


Figura 4.3.3. Comportamiento de las señales de amplificación de diferentes cantidades de ADN del plásmido pJETBI5' mediante PCR-TR. En A se observa el número de moléculas del plásmido pJETBI5' (eje de las X) y la fluorescencia detectada (eje de las Y) mediante PCR-TR, se encuentra que la R^2 es 0.9461. Debido a que los puntos con mayor dilución la fluorescencia es semejante al cero. Si estos últimos tres puntos son eliminados (B) la R^2 es 0.9968.

4.4. Detección y cuantificación del número de copias virales presentes en muestras controles de líquido alantoideo y reproducibilidad de los ensayos.

Para cuantificar el número de copias virales presente en una muestra de líquido alantoideo se purificó el RNA viral, se sintetizó el cDNA y se amplificaron diferentes diluciones del cDNA viral. Para determinar el número de copias virales presentes, los resultados de Ct de la amplificación del cDNA viral se interpolaron en una curva estándar de amplificación construida con cantidades conocidas de los plásmidos de referencia. Esto fue realizado para cada uno de los virus estudiados (ver anexo11).

A partir de 500µl de líquido alantoideo de cada virus se purificó el ARN y se sintetizó el cDNA, se realizaron cuatro diluciones decuples seriadas, las que se emplearon para establecer el número promedio de copias del virus/ml de líquido alantoideo. Para evaluar el grado de reproducibilidad de los resultados de los ensayos de cuantificación, cada experimento se realizó por triplicado.

En el cuadro 4.4.1 se muestra el número de copias virales por mililitro de líquido alantoideo obtenido en cada experimento y por cada virus.

Cuadro 4.4.1. Cuantificación viral y grado de reproducibilidad de los resultados en tres líquidos alantoideos. Se muestra el número promedio de copias virales por mililitro de líquido alantoideo de cada virus.

Experimento	Influenza aviar	Enfermedad de Newcastle	Bronquitis infecciosa
1	$1 \times 10^{9.91}$	$1 \times 10^{11.21}$	$1 \times 10^{10.73}$
2	$1 \times 10^{9.86}$	$1 \times 10^{11.2}$	$1 \times 10^{10.8}$
3	$1 \times 10^{9.79}$	$1 \times 10^{11.26}$	$1 \times 10^{10.83}$

El coeficiente de correlación intraclase obtenido de los valores de cada cuantificación de cada virus fue de 0.9833 para IA, 0.9675 para EN y 0.9800 para BI.

4.5. Comparación de títulos virales

Para cada muestra de líquido alantoideo de cada virus se determinaron los títulos empleando métodos virológicos y se compararon con el número de moléculas obtenidos por PCR-TR de dichas muestras.

El sistema de detección del virus de influenza también se ensayo con dos muestras de líquido alantoideo de influenza porcina (H3N2 y H1N2) (proporcionadas por el departamento de producción animal cerdos, UNAM), encontrando que igualmente fueron amplificadas y cuantificados, ver cuadro 4.5.1.

En el cuadro 4.5.1 se compara el título viral de líquido alantoideo obtenido por métodos virológicos con el número de moléculas obtenido mediante PCR-TR de cada virus.

Cuadro 4.5.1. Comparación del número de moléculas y el título viral. Se muestra para cada virus por mililitro de líquido alantoideo el título viral calculado en embrión de pollo y el número de moléculas obtenido mediante PCR-TR.

Virus	Título DIEP ₅₀ *	# copias/ml líquido alantoideo
INFLUEZA AVIAR	1 X 10 ^{7.5} /ml	1 X 10 ^{9.85}
NEWCASTLE	1 X 10 ^{8.7} /ml	1 X 10 ^{11.22}
BRONQUITIS	1 X 10 ^{7.6} /ml	1 X 10 ^{10.78}
Virus Influenza porcina H3N2	---	1 X 10 ⁷
Virus Influenza porcina H1N2	---	1 X 10 ^{7.69}

*DIEP₅₀: dosis infectante embrión de pollo 50%

Realizando la comparación del número de unidades ($\text{DIEP}_{50}/\text{ml}$) y el número de moléculas por mililitro de líquido alantoideo se obtiene que una unida ($\text{DIEP}_{50}/\text{ml}$) del virus de IA equivale a 223.87 moléculas por ml, en el caso del virus de EN es de 331.13 moléculas por ml y para el virus de BI es de 1513.56 moléculas por ml.

4.6. Detección de más de un virus en un tubo

En las figuras 4.6.1, 4.6.2 y 4.6.3, se muestra el diseño de los experimentos donde se evaluó la eficiencia de amplificación de cada uno de los plásmidos de forma independiente y en presencia de otros dos ADNs. Se aprecia que las curvas de amplificación en todos los casos son muy similares con valores de regresión muy parecidos.

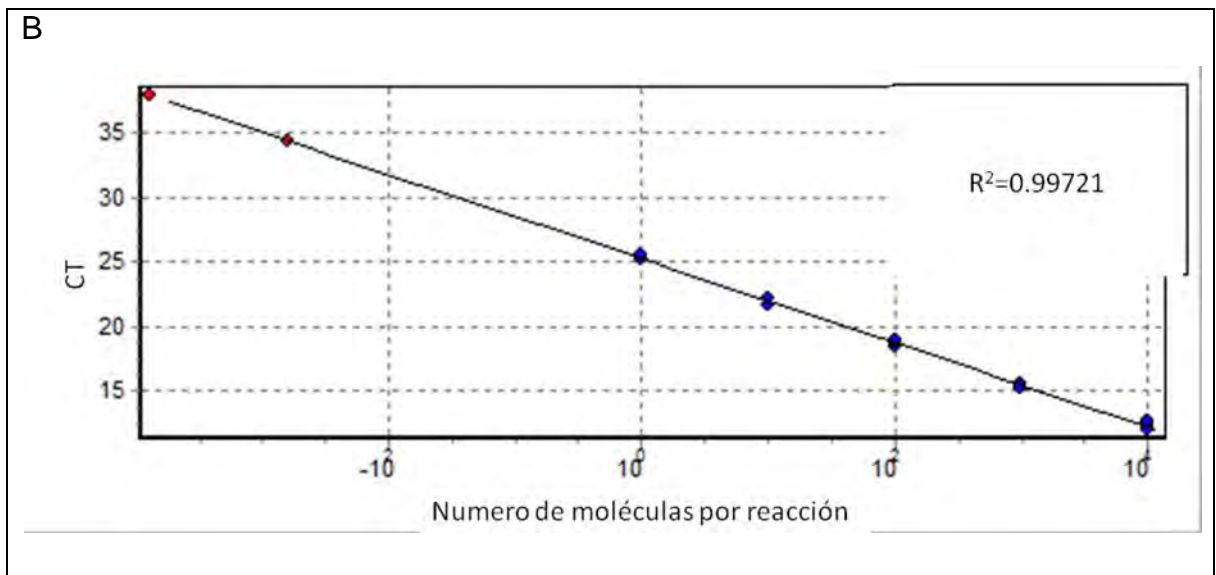
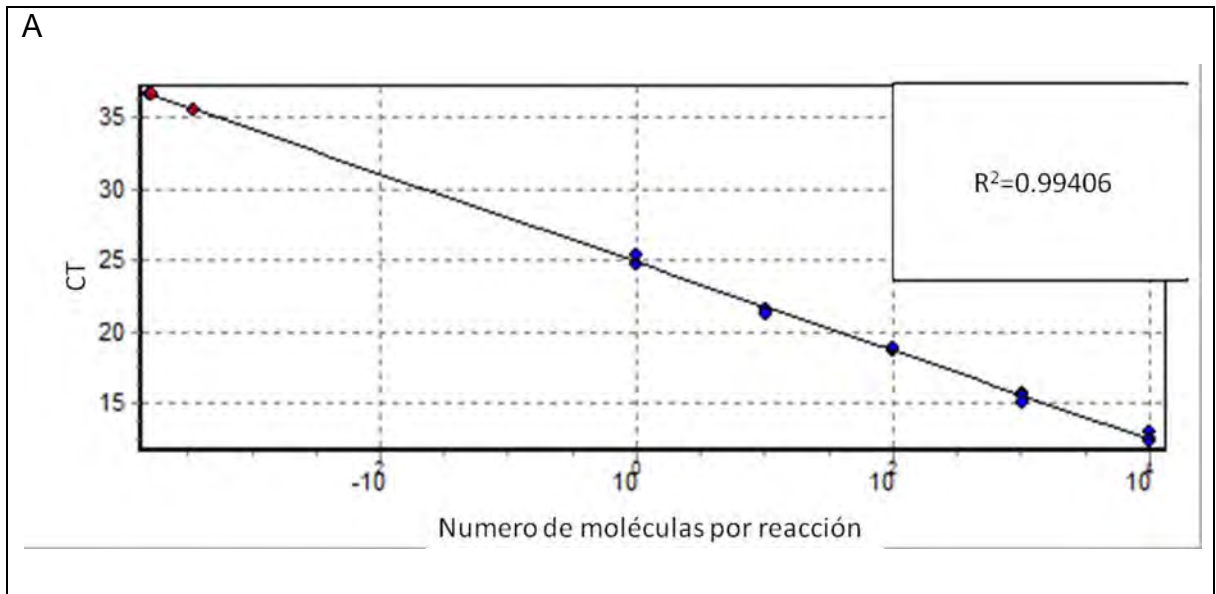


Figura 4.6.1. Ensayo de interferencia de 3 blancos de amplificación en la amplificación específica del segmento diagnóstico localizado en el plásmido pIAMT. Se comparan las curva estándar de amplificación, en A contiene el ADN de 3 plásmidos (pIAMT, pJETENM y pJETBI5') y el juego específico de oligonucleótidos (iniciadores y sonda) para IA (M + 25, M - 124 y M + 64). En B se tiene la curva estándar de amplificación del plásmido pIAMAT de forma independiente.

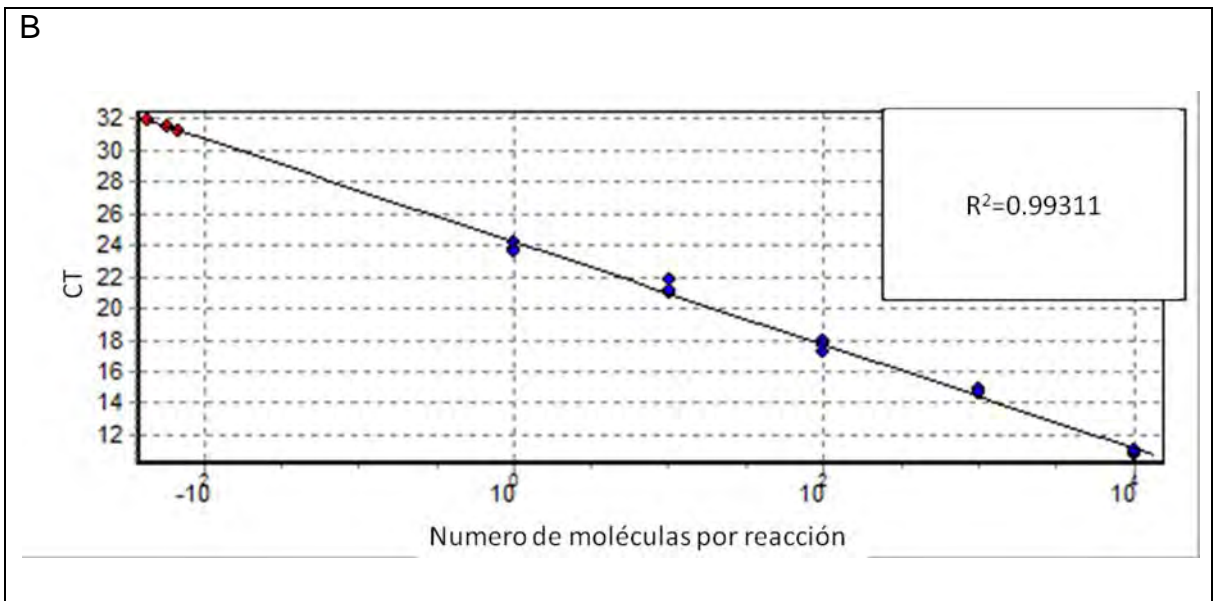
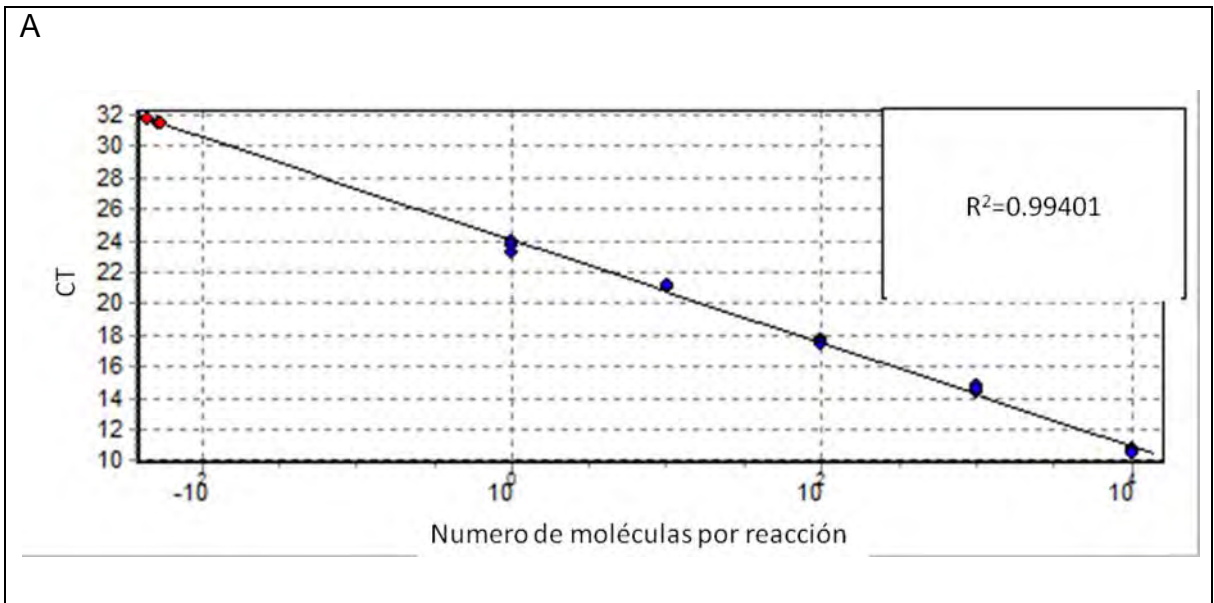


Figura 4.6.2. Ensayo de interferencia de 3 blancos de amplificación en la amplificación específica del segmento diagnóstico localizado en el plásmido pJETENM. Se comparan las curva estándar de amplificación, en A contiene el ADN de 3 plásmidos (pIAMT, pJETENM y pJETBI5') y el juego específico de oligonucleótidos (iniciadores y sonda) para EN (M+4100, M-4220 y M+4169). En B se tiene la curva estándar de amplificación del plásmido pJETENM de forma independiente.

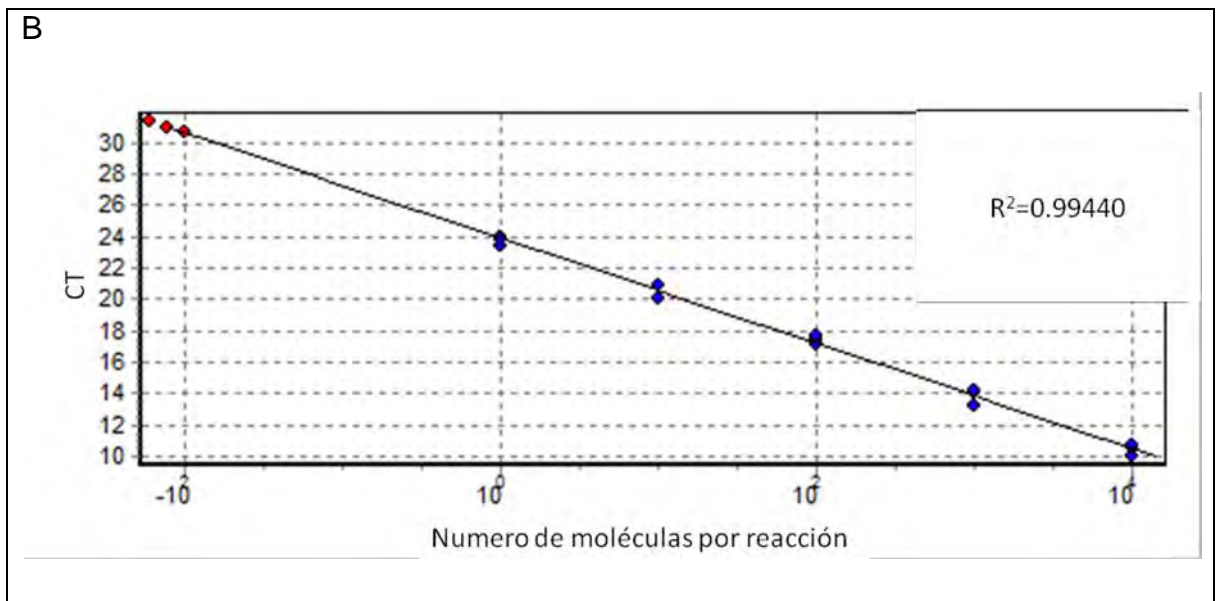
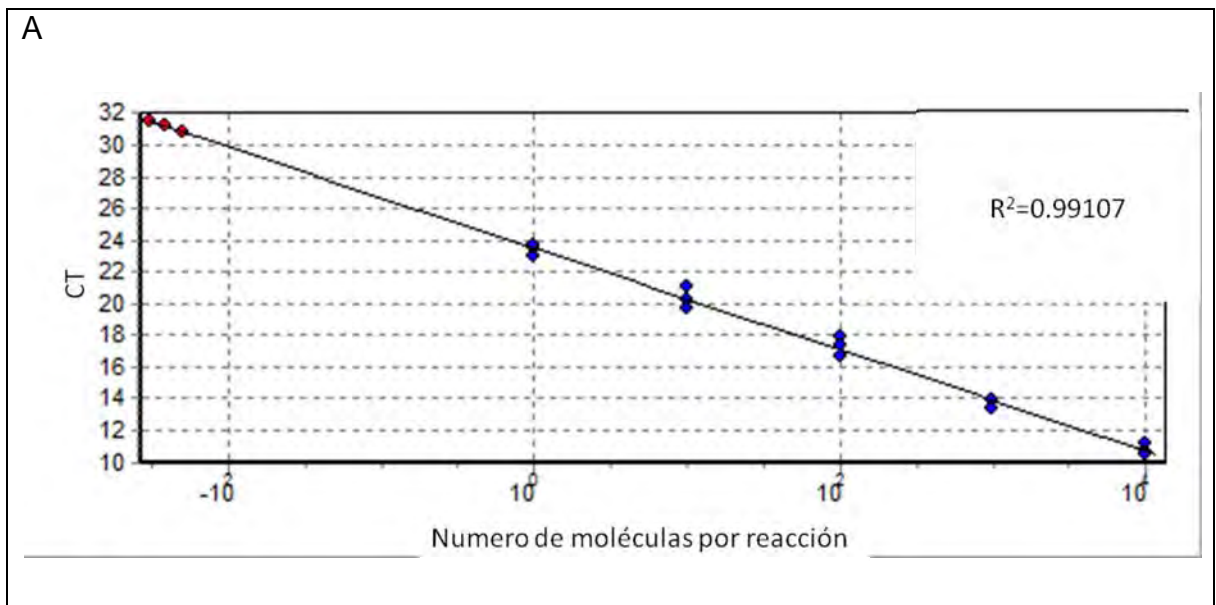


Figura 4.6.3. Ensayo de interferencia de 3 blancos de amplificación en la amplificación específica del segmento diagnóstico localizado en el plásmido pJETBI5'. Se comparan las curva estándar de amplificación, en A contiene el ADN de 3 plásmidos (pIAMT, pJETENM y pJETBI5') y el juego específico de oligonucleótidos (iniciadores y sonda) para BI (IBV5'GU391, IBV5'GL533 y IBV5'G probe). En B se tiene la curva estándar de amplificación del plásmido pJETBI5' de forma independiente.

En las figuras 4.6.4, 4.6.5 y 4.6.6, se muestra el diseño de los experimentos donde se evaluó se evaluó la eficiencia de amplificación de cada uno de los segmentos diagnósticos en presencia del juego de oligonucleótidos (iniciadores y sonda) específicos para cada plásmido y en presencia de los tres juegos de oligonucleótidos y tres sondas utilizados para amplificar los tres segmentos diagnósticos. Se aprecia que las curvas de amplificación en todos los casos son muy similares con valores de regresión muy parecidos.

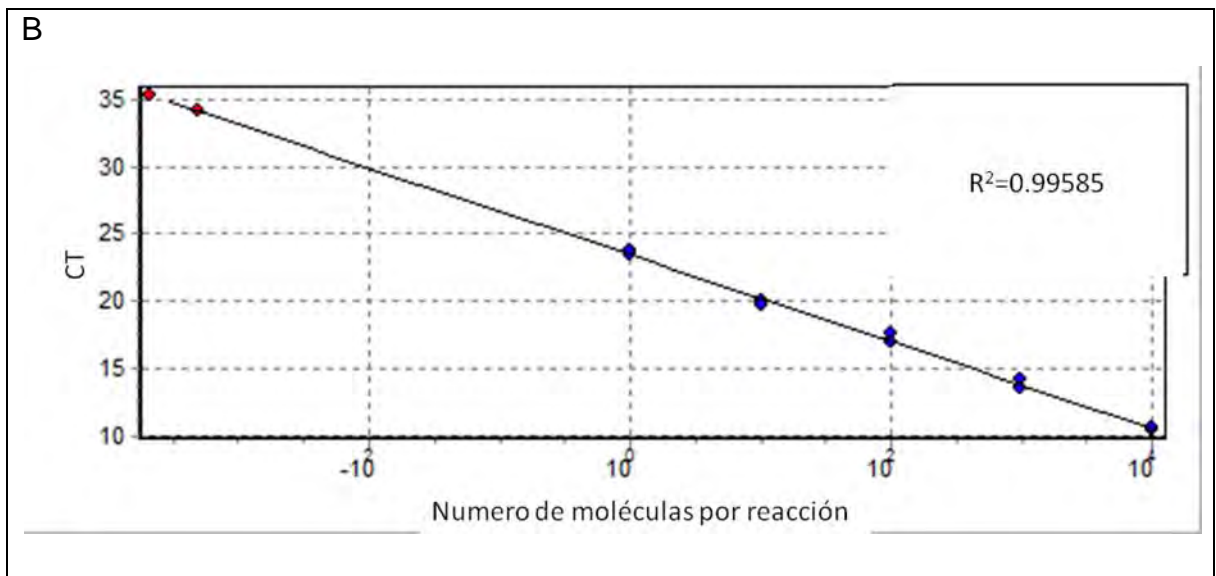
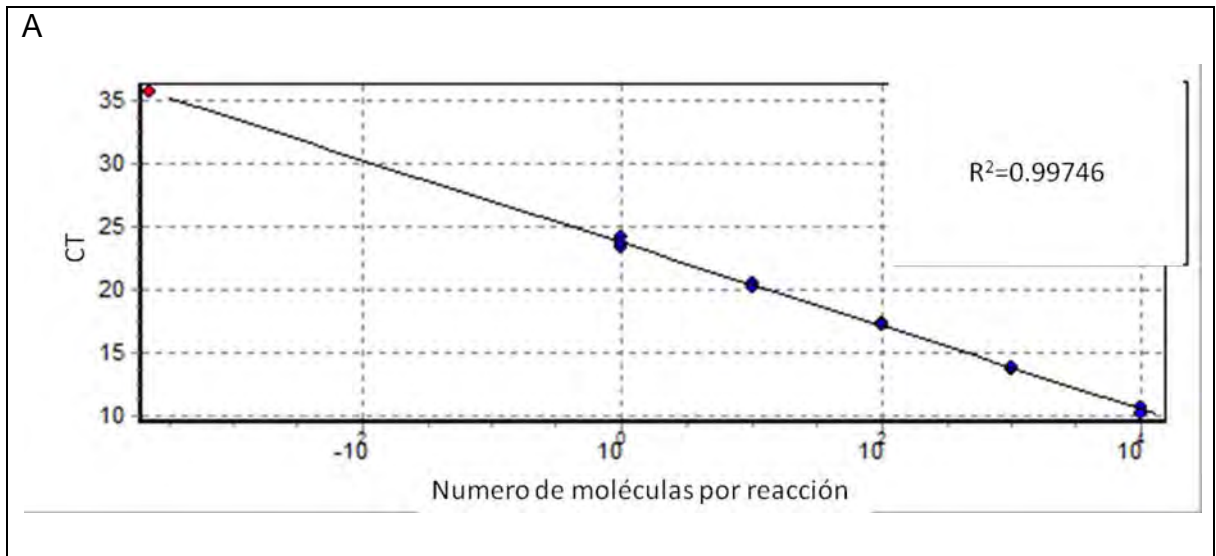


Figura 4.6.4. Ensayo de interferencia de 3 juegos de oligonucleótidos y sondas en la amplificación específica del segmento diagnóstico localizado en el plásmido pIAMT. Se comparan las curva estándar de amplificación, en A contiene el ADN del plásmido pIAMT y los tres juegos de oligonucleótidos (iniciadores y sonda) para IA, EN y BI (M + 25, M - 124 y M + 64; M+4100, M-4220 y M+4169; IBV5'GU391, IBV5'GL533 y IBV5'G probe). En B se tiene la curva estándar de amplificación del plásmido pIAMT en presencia del juego de oligonucleótidos y sonda específico para IA (M + 25, M - 124 y M + 64).

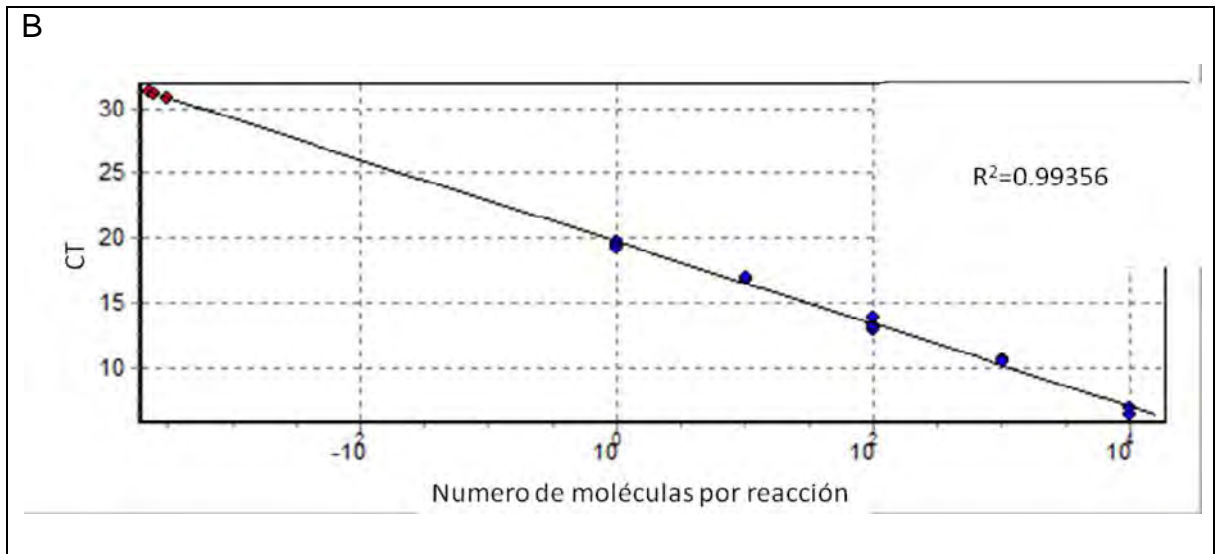
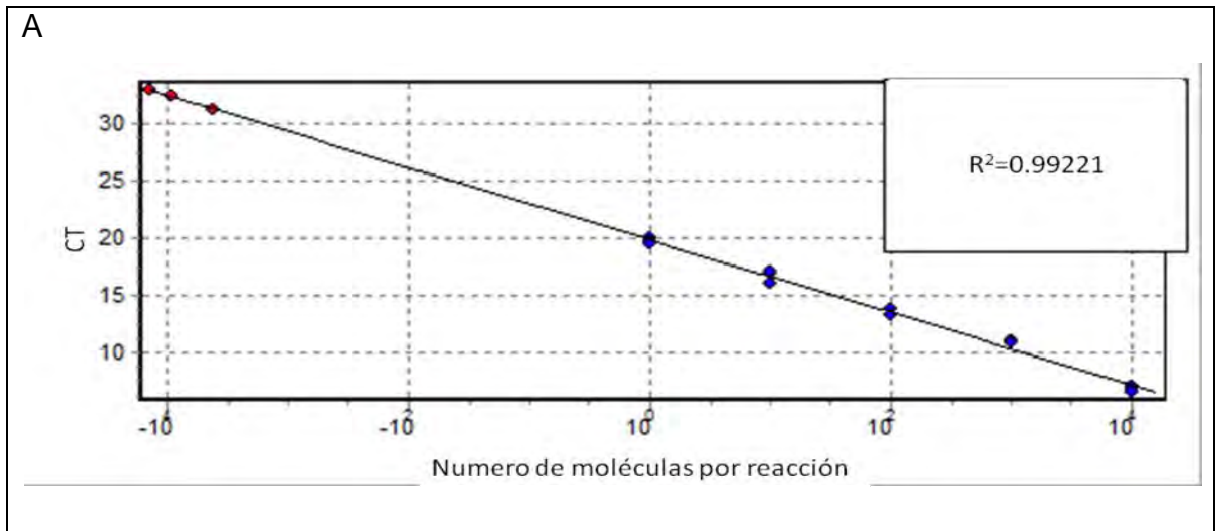


Figura 4.6.5. Ensayo de interferencia de 3 juegos de oligonucleótidos y sondas en la amplificación específica del segmento diagnóstico localizado en el plásmido pJETENM. Se comparan las curva estándar de amplificación, en A contiene el ADN del plásmido pJETENM y los tres juegos de oligonucleótidos (iniciadores y sonda) para IA, EN y BI (M + 25, M – 124 y M + 64; M+4100, M-4220 y M+4169; IBV5'GU391, IBV5'GL533 y IBV5'G probe). En B se tiene la curva estándar de amplificación del plásmido pJETENM en presencia del juego de oligonucleótidos y sonda específico para EN (; M+4100, M-4220 y M+4169).

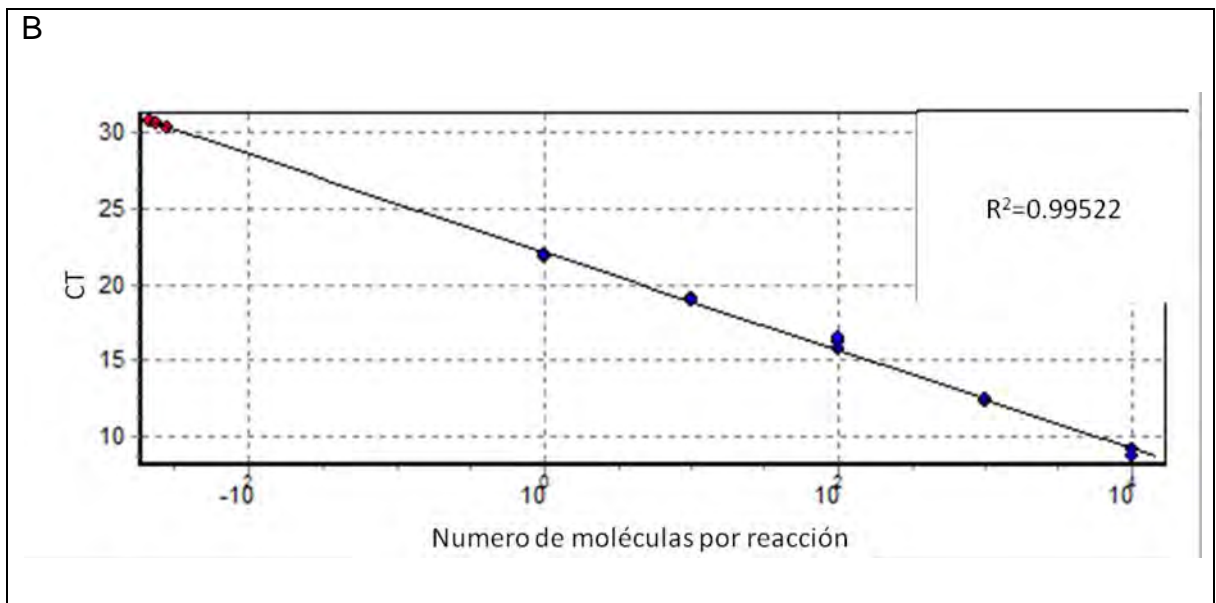
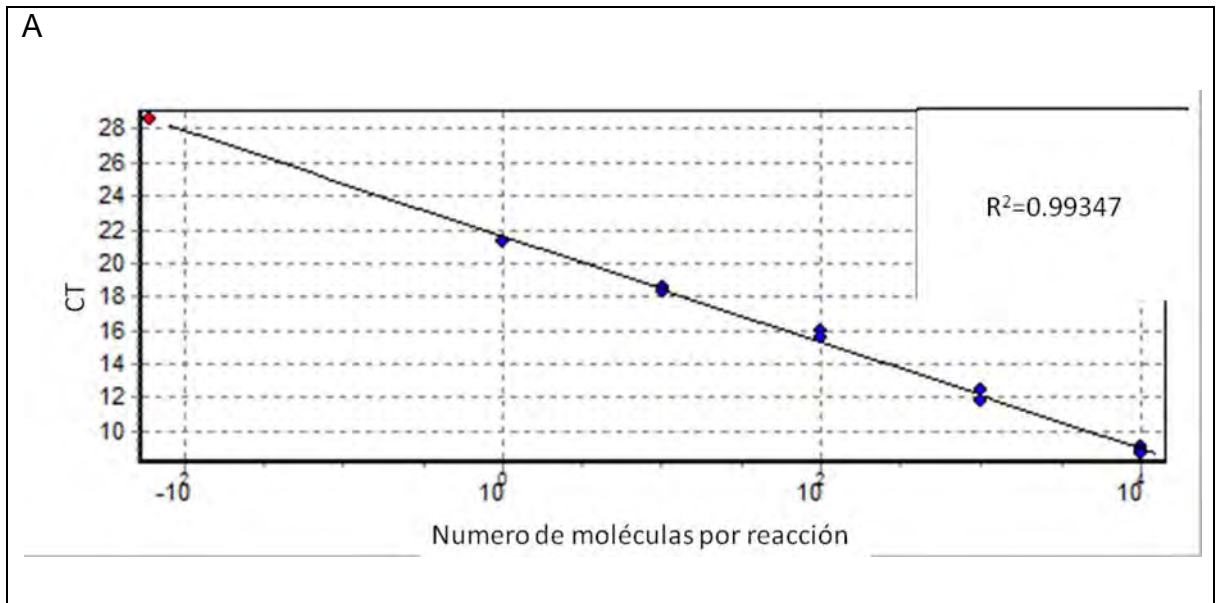


Figura 4.6.6. Ensayo de interferencia de 3 juegos de oligonucleótidos y sondas en la amplificación específica del segmento diagnóstico localizado en el plásmido pJETBI5'. Se comparan las curva estándar de amplificación, en A contiene el ADN del plásmido pJETBI5' y los tres juegos de oligonucleótidos (iniciadores y sonda) para IA, EN y BI (M + 25, M - 124 y M + 64; M+4100, M-4220 y M+4169; IBV5'GU391, IBV5'GL533 y IBV5'G probe). En B se tiene la curva estándar de amplificación del plásmido pJETBI5' en presencia del juego de oligonucleótidos y sonda específico para BI (IBV5'GU391, IBV5'GL533 y BV5'G probe).

En las figuras 4.6.7, 4.6.8 y 4.6.9, se muestra el diseño de los experimentos donde se evaluó la eficiencia de amplificación de los segmentos diagnóstico localizado en los tres plásmidos de manera simultánea y de forma independiente. Se aprecia que las curvas de amplificación en todos los casos son muy similares con valores de regresión muy parecidos.

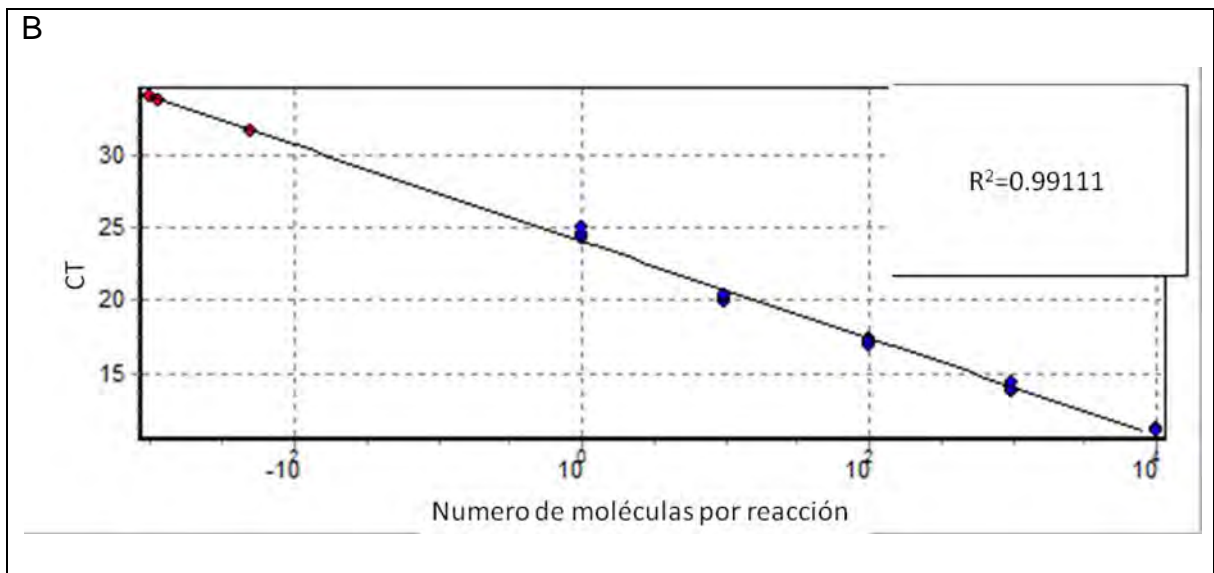
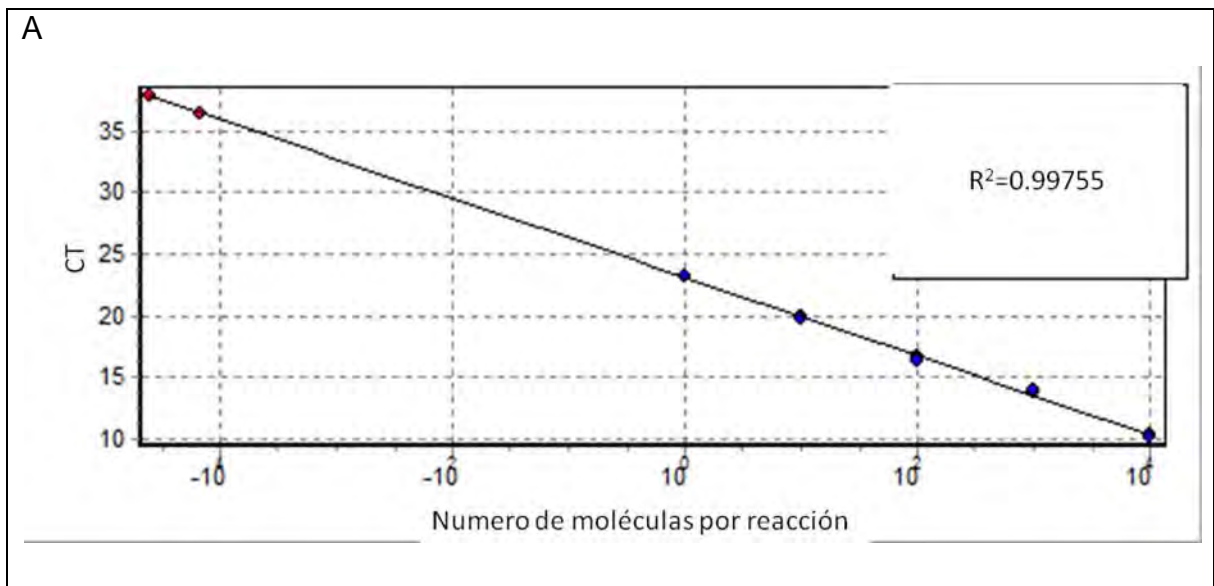


Figura 4.6.7. Ensayo de interferencia de 3 blancos de amplificación en la amplificación específica del segmento diagnóstico localizado en el plásmido pIAMT. Se comparan las curva estándar de amplificación, en A contiene el ADN de 3 plásmidos (pIAMT, pJETENM y pJETBI5') y los tres juegos de oligonucleótidos (iniciadores y sonda) para IA, EN y BI (M + 25, M - 124 y M + 64; M+4100, M-4220 y M+4169; IBV5'GU391, IBV5'GL533 y IBV5'G probe). En B se tiene la curva estándar de amplificación del plásmido pIAMAT de forma independiente.

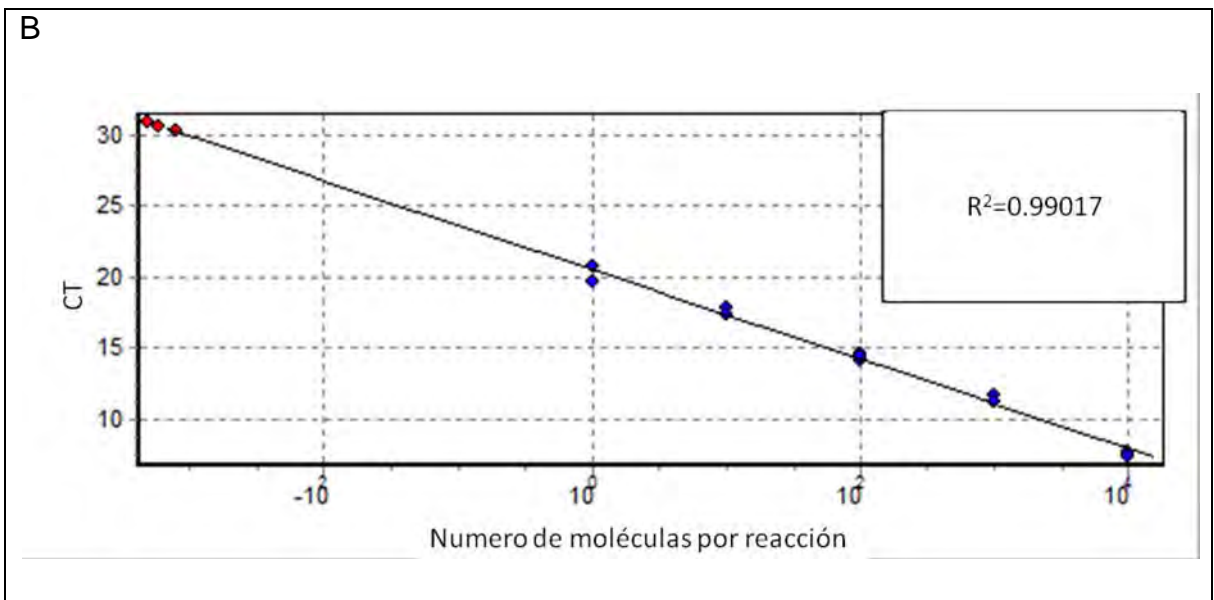
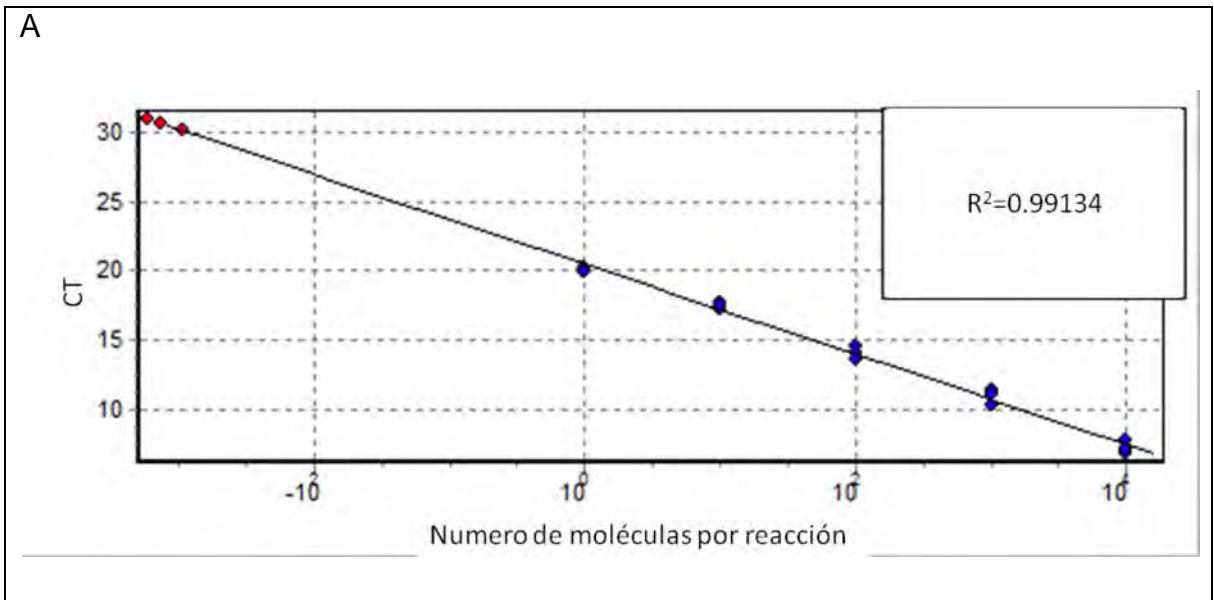


Figura 4.6.8. Ensayo de interferencia de 3 blancos de amplificación en la amplificación específica del segmento diagnóstico localizado en el plásmido pJETENM. Se comparan las curva estándar de amplificación, en A contiene el ADN de 3 plásmidos (pIAMT, pJETENM y pJETBI5') y los tres juegos de oligonucleótidos (iniciadores y sonda) para IA, EN y BI (M + 25, M – 124 y M + 64; M+4100, M-4220 y M+4169; IBV5'GU391, IBV5'GL533 y IBV5'G probe). En B se tiene la curva estándar de amplificación del plásmido pJETENM de forma independiente.

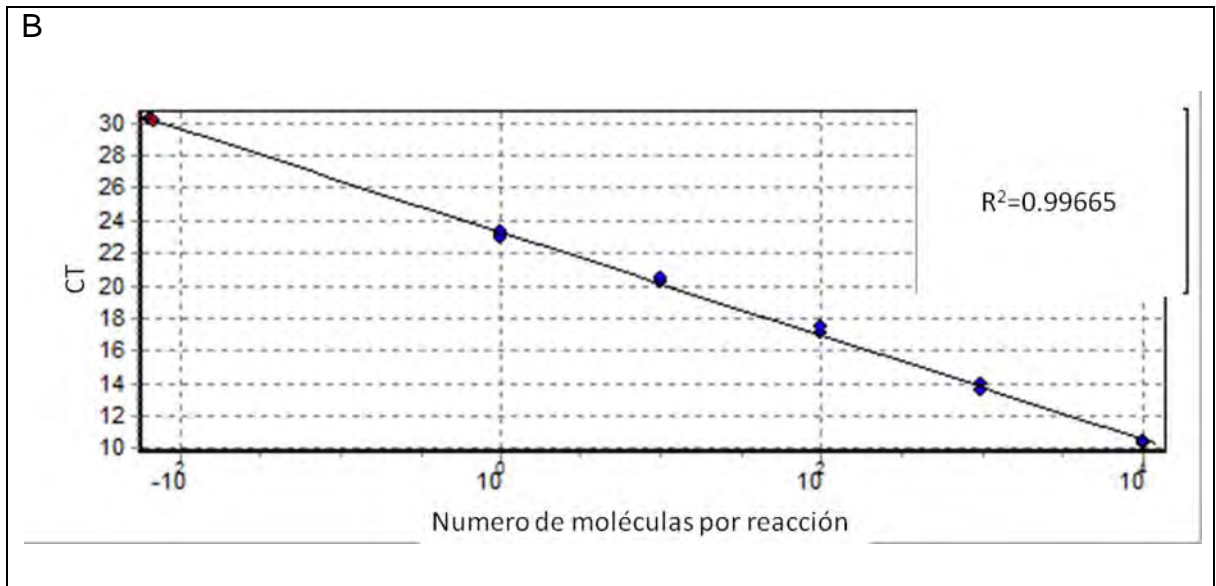
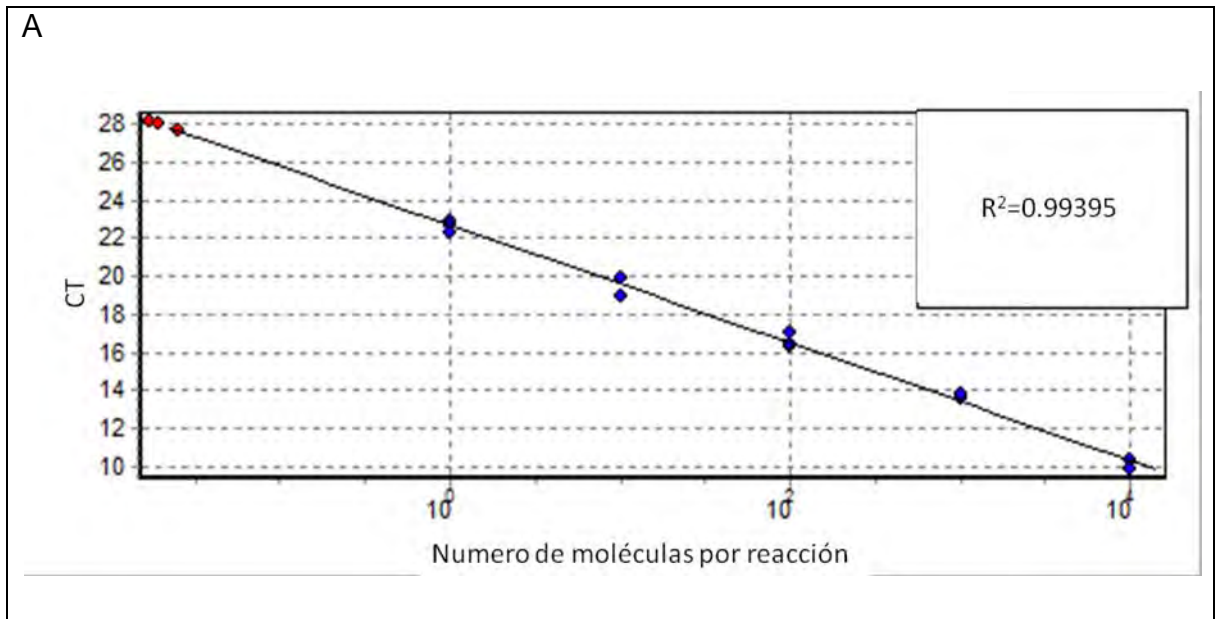


Figura 4.6.9. Ensayo de interferencia de 3 blancos de amplificación en la amplificación específica del segmento diagnóstico localizado en el plásmido pIAMT. Se comparan las curva estándar de amplificación, en A contiene el ADN de 3 plásmidos (pIAMT, pJETENM y pJETBI5') y los tres juegos de oligonucleótidos (iniciadores y sonda) para IA, EN y BI (M + 25, M – 124 y M + 64; M+4100, M-4220 y M+4169; IBV5'GU391, IBV5'GL533 y IBV5'G probe). En B se tiene la curva estándar de amplificación del plásmido pJETBI5' de forma independiente.

4.7. Transcripción reversa y PCR-TR en un solo paso múltiple.

Para evaluar la transcripción reversa y la amplificación por PCR-TR (TR-PCR-TR) en un solo tubo, se purificó el RNA de la mezcla de el mismo volumen (100ul y 10ul) de líquidos alantoideos positivos para el virus de IA, BI y EN. El ARN se suspendió en 20 μ l de H₂O DEPC, a partir de este volumen se tomó una alícuota de (7.5 μ l) para efectuar la TR-PCR-TR en un solo tubo con la intención de detectar y cuantificar a los 3 virus. Conjuntamente se efectuaron curvas de amplificación estándar para los 3 virus en una sola reacción. Para esto se colocaron diversas cantidades de cada plásmido (pIAMT= 3.6 ng, 0.36 ng, 0.036 ng, 0.0036 ng y 0.00036 ng; pJETENM= 15.35 ng, 1.535 ng, 0.1535 ng, 0.01535 ng y 0.001535 ng; pJETBI5'= 31.43 ng, 3.143 ng, 0.3143 ng, 0.03143 ng y 0.003143 ng). En la figura 3.7.1 se observan las curvas estándar de cada plásmido con sus respectivos valores de R².

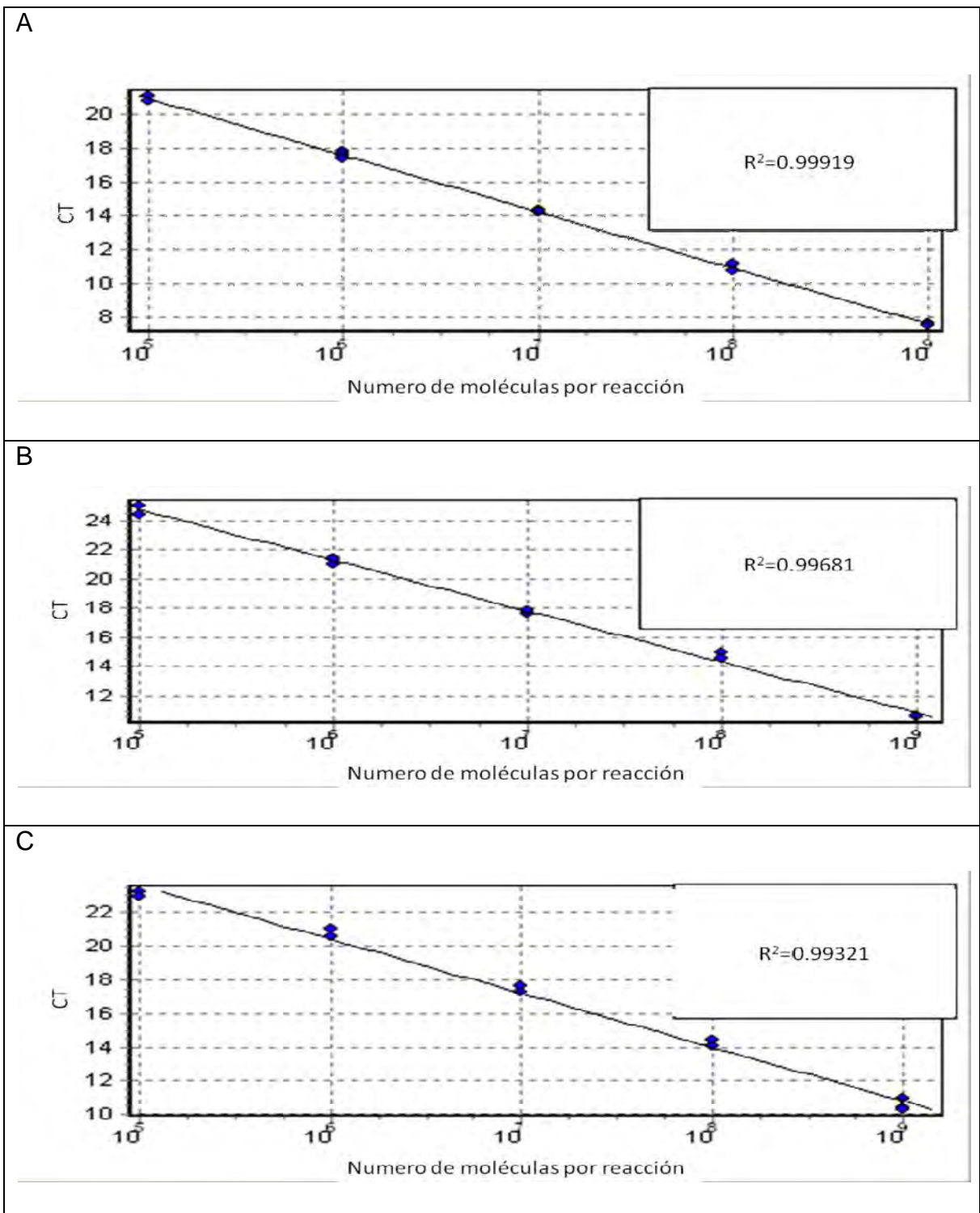


Figura 4.7.1. Curvas estándar de amplificación construidas con los plásmidos pIAMT (A), pJETENM (B) y pJETBI5' (C) en una solo ensayo. Los puntos rojos indican la posición del Ct de la amplificación de las 2 diluciones de cada virus. Se observa la R^2 de cada curva estándar construida con cada plásmido.

Al interpolar a la curva estándar de amplificación los valores de Ct de la amplificación de una alícuota de una mezcla de 10ul y de 100ul del líquido alantoideo de cada virus, se logro cuantificar a cada uno de los virus. En el cuadro 4.7.1 se muestran los valores obtenidos de dicha cuantificación.

Cuadro 4.7.1. Cuantificación de los virus de IA, EN y BI mediante Transcripción Reversa y PCR-TR múltiple. Se muestra el nombre del virus, y los valores obtenidos mediante la cuantificación por medio de RRT-PCR múltiple.

Virus	ng/ μ l	# moléculas/ μ l
IA	.05	13710817
EN	1.55	465140577
BI	0.5	148785172

V. DISCUSIÓN

El aislamiento viral puede detectar solamente virus vivo. Los virus pueden inactivarse durante el transporte y/o manejo del mismo y no ser detectados por aislamiento viral, pero pueden ser potencialmente detectados mediante PCR-TR¹⁵. Debido a esto la PCR-TR además de su rapidez y bajo costo comparada con el aislamiento viral, es una opción para la detección de partículas virales inactivadas o que no se han adaptado al embrión de pollo.

Por otro lado existen factores que pueden ser adversos para la PCR-TR como sustancias inhibidoras en la muestra, procedimientos ineficientes de extracción del ARN y la potencial degradación del ARN antes de la reacción, etc¹⁵. Factores ajenos a la PCR son las variaciones genéticas del blanco de amplificación en el sitio de hibridación de los oligonucleótidos, impidiendo su detección mediante este método. La sensibilidad de la detección de cualquier segmento mediante PCR-TR se puede relacionar a la especificidad de la secuencia de la sonda, así como con fenómenos como estructuras secundarias (esto puede ocurrir con los oligonucleótidos o con el blanco de amplificación), etc.

El ácido nucleico viral no detectado mediante PCR-TR, pero sí detectado mediante aislamiento viral sugiere que la primera no remplace a la segunda completamente.

5.1. Sensibilidad

La RT-PCR de un solo paso disminuye el riesgo de contaminación cruzada debido a que el tubo no se abre una vez que el ácido nucleico se añade. Sin embargo se ha observado que la RT-PCR de un solo paso es menos sensible que RT-PCR de dos pasos²⁷. Es por ello que en este trabajo se utilizó RT-PCR-TR en dos pasos para evaluar la sensibilidad.

En un estudio donde se desarrolló PCR-TR de un solo paso con sonda de hidrólisis para diagnóstico de muestras clínicas, identificando influenza tipo A, se diseñaron oligonucleótidos los cuales sirven para detectar el gen de la proteína de matriz (sirven para detectar virus de influenza aviar, influenza equina, influenza humana e influenza porcina). El gen de la proteína M del virus de influenza aviar fue clonado en el vector pAMP1, el cual se utilizó para transcribir ARN in vitro y utilizarlo para determinar el límite de detección de los ensayos. El mínimo número de copias detectado del gen de la proteína matriz fue aproximadamente 10^3 copias del gen o 10 fg¹⁵.

En este trabajo se utilizaron los mismos oligonucleótidos que en el trabajo mencionado, para amplificar y detectar mediante PCR-TR un fragmento de 101 pb del gen de la proteína M de virus influenza tipo A. Utilizando como control el ADN del plásmido pIAMT para construir la curva de sensibilidad (sin realizar transcripción in vitro) se observó que la detección mínima del número de moléculas de este plásmido fue de 10^4 o aproximadamente 100 fg.

En el trabajo primeramente mencionado también se secuenció el gen de la proteína M de seis individuos que fueron positivos al aislamiento viral, pero negativos a PCR-TR revelando que no había variación en la región de hibridación de la sonda (M+64). Un aislamiento tenía un cambio de una sola base (A por una G) el cual se localizaba en el extremo 5' del iniciador M+25 y también allí se detectó un cambio (una T por una C) en el extremo 5' del iniciador M-124 en todos los aislamientos secuenciados. Las variaciones en la secuencia del gen de la matriz del virus de influenza aviar, explican porque la PCR-TR puede fallar al detectar este virus en muestras que son positivas al aislamiento viral¹⁵. Es muy importante considerar lo anterior debido a que existe la posibilidad de que esta prueba diagnóstica produzca un falso negativo con cepas con variación genética en el sitio de hibridación de los oligonucleótidos.

En un estudio se desarrollo una RT-PCR para detectar y cuantificar al virus de la enfermedad de Newcastle en muestras clínicas aviares. Este desarrollo incluye el diseño de oligonucleótidos que se basó en una región altamente conservada cerca del extremo 5' del gen de la proteína M del virus de la Enfermedad de Newcastle y permite la detección de todos los *Paramixovirus aviar-1* (APMV-1)²¹.

El fragmento diagnostico del APMV-1 fue clonado en el vector TOPO-XL, el vector con el inserto se utilizó para transcribir ARN in vitro, el cual se utilizó para determinar el límite de detección de los ensayos. Se encontró que los oligonucleótidos que detectan el gen de la proteína M de los APMV-1 pueden detectar hasta 10^3 copias de ARN transcrito in vitro.

En este trabajo se utilizaron los mismos oligonucleótidos y se manejo como control el ADN del plásmido pJETENM (no se realizó transcripción in vitro) para construir la curva de sensibilidad y se observó que la detección mínima del número de moléculas de este plásmido fue de 10^4 o aproximadamente 100 fg.

En un estudio se reporta el desarrollo y evaluación de ensayos de RT-PCR tiempo real utilizando una sonda Taqman para detectar y cuantificar el ARN genómico del IBV. El ensayo amplifica un producto de 143 pb el cual es una secuencia altamente conservada localizada en el extremo 5' del genoma del IBV y tiene un límite de detección y cuantificación de 100 copias del templado (ARN transcrito in vitro) por reacción²³.

El límite de la detección y cuantificación de los ensayos fue evaluado mediante la generación de una curva estándar con transcritos de ARN sintetizados in vitro. Se encontró que los oligonucleótidos que detectan el fragmento de 143 pb en el extremo 5' del genoma del IBV pueden detectar hasta 10^2 copias del gen a partir de ARN transcrito in vitro.

En este trabajo utilizando los mismos oligonucleótidos y el ADN del plásmido pJETBI5' (sin llevar a cabo transcripción in vitro), como control para construir la curva de sensibilidad, se observó que la detección mínima del número de moléculas de este plásmido fue de 10^4 o aproximadamente 100 fg.

En general en nuestros ensayos se obtuvieron valores de sensibilidad por el rango de 10^4 moléculas. En cambio en varios trabajos reportan límites de detección de 10^3 a 10^2 moléculas. La diferencia entre los valores de sensibilidad obtenidos en este trabajo en comparación a los reportados (15, 21 y 23) es difícil explicarlo, pero puede deberse a la forma en que se determina el nivel de sensibilidad. En este trabajo para construir la curva de sensibilidad se empleó ADN de los blancos de amplificación clonados en un plásmido, en los trabajos revisados se emplea ARN transcrito in vitro.

Se sabe que la replicación retroviral envuelve un complejo suceso de acontecimientos que son catalizados por la transcriptasa reversa (RT)³⁴. Cuando se lleva a cabo la transcripción reversa, la eficiencia de esta reacción está determinada por varios factores tales como la calidad del ARN disponible que se usara como plantilla, las estructuras secundarias que el ARN pueda formar, la especificidad de la hibridación del iniciador, el tiempo de la reacción etc. Todos estos factores propician que la eficiencia de la reacción no sea la misma en la síntesis del cDNA a partir de diferentes segmentos de ARN, o de un mismo segmento en diferentes reacciones. Por lo anterior al tratar de estimar el número real de copias de un segmento de ARN, es difícil saber si se está obteniendo el 100% de la estimación.

El utilizar ARN, en lugar de ADN, como control de referencia de cuantificación en las reacciones de RT-PCR-TR para cuantificar el número de moléculas de ARN, en las muestras es más costoso y lleva más tiempo, ya que para obtener los controles hay que realizar síntesis in vitro del ARN control. Sin embargo, el utilizar ARN como control de cuantificación puede ayudar a disminuir

el error en la estimación del número de moléculas de la muestra ya que el factor “eficiencia de la reacción de RT” se homogeniza en los controles y en las muestras. Si se emplea ADN como control de cuantificación no se considera la merma presente en la reacción de RT, por lo que se tiende a subestimar el número de copias presentes en la muestra.

En este trabajo no se realizó síntesis de ARN in vitro a partir de los plásmidos (pIAMT, pJETENM y pJETBI5') para emplearlo como control de cuantificación por falta de tiempo y el elevado costo. Esto quiere decir que el error en la estimación del número de moléculas aumento, esto también puede explicar la disminución de la sensibilidad en los ensayos realizados en este trabajo.

En este trabajo se evaluaron diferentes condiciones de amplificación en donde se varió la concentración de iniciadores, de sonda, de $MgCl_2$, RT, Taq polimerasa, Dimetil Sulfóxido (DMSO) y Formamida, también se probaron varias temperaturas de extensión/alineación, encontrando las mejores condiciones, que son las que se emplearon y reportan. La aparente disminución en la sensibilidad de los ensayos también puede explicarse por la posible falta de rigor en las condiciones amplificación, que en ocasiones no se describe claramente. Cabe mencionar que en este trabajo no se empleó un protocolo de hot-start, lo que también podría influir en la aparente menor sensibilidad.

5.2. Reproducibilidad

La reproducibilidad de los ensayos en la detección de cada virus se evaluó al realizar tres experimentos independientes en los cuales al interpolar los valores de Ct de la amplificación de cDNA en los de la curva estándar se determino el número promedio de copias del virus/ml de líquido alantoideo. El coeficiente de correlación intraclase obtenido de los valores de cada cuantificación de cada virus fue de 0.9833 para IA, 0.9675 para EN y 0.9800 para BI.

5.3. Comparación de títulos virales (dosis infectante embrión de pollo 50% vs número de copias).

Cuando se compararon los títulos virales obtenidos mediante embrión de pollo y el número de copias obtenido mediante PCR-TR de las muestras de líquido alantoideo de cada virus se observó una gran variación en las equivalencias.

Por lo anterior los datos obtenidos en este trabajo no son concluyentes ya que solo se evaluó una cepa por cada virus, requiriéndose evaluar un mayor número de estas. Sin embargo las equivalencias obtenidas son un primer acercamiento al problema.

Es necesario realizar un estudio minucioso si se quieren obtener conclusiones objetivas a cerca de las equivalencias entre una unidad dosis infectante embrión de pollo 50% y el número de moléculas calculado mediante qPCR, ya que esta equivalencia puede variar debido a factores como la diferente adaptación de diferentes cepas de un virus al embrión de pollo (que puede estar determinado por el número de pases que se le hayan dado en su aislamiento) y la variación en la producción de partículas defectivas, producto de la variación en la eficiencia de replicación de cada cepa. Por otro lado la precisión de la cuantificación del ADN empleado como control estándar de amplificación.

5.4. Detección de más de un virus en un tubo (PCR-TR múltiple).

Existen estudios donde se realiza PCR múltiple para realizar la detección del virus de influenza aviar y el virus de la enfermedad de Newcastle en un solo tubo^{28,29}, sin embargo no tienen las ventajas de la PCR-TR múltiple, como es la rapidez y sensibilidad. En este trabajo se realizó exitosamente la detección simultánea de los virus de influenza aviar, de la enfermedad de Newcastle y el de bronquitis infecciosa, con un nivel de detección igual a la PCR-TR independiente para cada virus.

La optimización de la PCR múltiple puede tener varias dificultades, incluyendo una baja sensibilidad o especificidad y/o preferencia por alguno de los productos de amplificación. La presencia de más de un juego de oligonucleótidos en la reacción incrementa la posibilidad de obtener productos inespecíficos de amplificación y la formación de dímeros de los oligonucleótidos. Los productos no específicos pueden ser amplificados de manera más eficiente que el blanco de amplificación específico, consumiendo los componentes de la reacción³⁰. Sin embargo en este trabajo, se demostró que los oligonucleótidos, sondas y controles estándares de amplificación utilizados en los ensayos múltiples aparentemente no interfieren con el producto de amplificación específico ni reduce la eficiencia de amplificación.

Al momento de diseñar los oligonucleótidos, es importante tener en cuenta parámetros como la homología de los oligonucleótidos con su secuencia diana, su longitud, el contenido de GC y la concentración final de la reacción. Idealmente todos los juegos de oligonucleótidos incluidos en la PCR múltiple, deben permitir una eficiencia en la amplificación similar, en sus respectivos blancos de amplificación³⁰.

5.5. RT-PCR TR múltiple en un tubo

La RT-PCR-TR como ya se mencionó tiene el inconveniente de ser menos sensible que la RT-PCR-TR de dos pasos²⁷, pero por otro lado la primera tiene la ventaja de ser más rápida además de tener menor riesgo de contaminación que la segunda, esto es altamente benéfico cuando se trabaja con un número elevado de muestras, donde el tiempo es una limitante y el riesgo de contaminación aumenta. La RT-PCR-TR múltiple incrementa el beneficio de la rapidez y disminuye el riesgo de contaminación aun más que la RT-PCR-TR, debido a que solo se realiza una prueba para detectar a más de un virus en un solo tubo.

En este trabajo se realizó RT-PCR-TR múltiple para detectar a los virus de IA, EN y BI en un mismo tubo. También se construyeron curvas de calibración con sus respectivos controles, con las cuales es posible cuantificar si así se desea el número de moléculas o la cantidad de masa de cada virus.

5.6. Especificidad en la detección de cepas virales mediante PCR-TR utilizando iniciadores y sondas específicos para IA, EN y BI.

La secuencia de nucleótidos de iniciadores y sondas utilizados en este trabajo, fueron tomados de trabajos previos. En estos trabajos se evaluó la especificidad de la amplificación en la detección de cada virus^{15, 21, 24}. Los iniciadores y sonda diseñados para detectar al virus de influenza A se probaron realizando la detección de este virus de 32 diferentes cepas del virus de influenza¹⁵. En el caso de los iniciadores y sonda diseñados para detectar al virus de la enfermedad de Newcastle pudieron detectar 38 diferentes cepas de paramixovirus aviar 1, pero no se detectó a los virus paramixovirus aviar 2, 3, 4 y 7²¹. Los iniciadores y sonda diseñados para el virus de bronquitis infecciosa detectaron 15 cepas de este virus adecuadamente, pero no detectaron a los virus de influenza aviar, virus de la enfermedad de Newcastle, paramixovirus aviar, coronavirus de *Meleagris gallipavo*, virus de Laringotraqueitis ni a *Mycoplasma gallisepticum*²⁴.

En este trabajo se evaluó la especificidad de cada uno de los oligonucleótidos en la amplificación del segmento diagnóstico en presencia de los otros dos segmentos diagnósticos restantes. Amplificando satisfactoriamente solo el segmento deseado en cada experimento.

VI. Conclusiones

Los objetivos planteados en este trabajo se cumplieron satisfactoriamente, aceptándose la hipótesis. Las aportaciones de este trabajo son las siguientes.

En este trabajo se clonaron los blancos de amplificación para cada virus generando los plásmidos pIAMT, pJETENM y pJETBI5' para emplearse como controles de amplificación específicos.

Se logró estandarizar la técnica de RT-PCR-TR para la identificación y cuantificación de los virus de IA, EN y BI.

Se encontró que al comparar los títulos virales determinados en embrión de pollo y el número de moléculas detectado por PCR-TR, las equivalencias no son consistentes.

Se logró amplificar y detectar específicamente cada fragmento diagnóstico de tres genomas virales en un mismo tubo de manera similar a la amplificación y detección independiente.

VII. LITERATURA CITADA

- 1.- Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JDC, Wengenack NL, Rosenblat JE, Cockerill III FR, Smith TF. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clinical Microbiology Reviews*. 2006;19:165-256.
- 2.- McPherson MJ. PCR. Springer. 2000
- 3.- Martínez A, Vega JL. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Unidad de Veterinaria. Departamento de Genética. Universidad de Córdoba (España). 2002.
- 4.- Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004;22:299-305.
- 5.- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>
- 6.- Fouchier RAM, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, Osterhaus ADME. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *Journal of Virology*. 2005;79: 2814–2822.
- 7.- Kawaoka Y, Chambers TM, Sladen WL Webster RG. Is the gene pool of influenza viruses in shorebirds and gulls different from that in wild ducks?. *Virology* 1988; 163: 247–250.
- 8.- Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1992;56:152–179.
- 9.- Okamatsu M, Saito T, Yamamoto Y, Mase M, Tsuduku S, Nakamura K, Tsukamoto K, Yamaguchi S. Low pathogenicity H5N2 avian influenza outbreak in Japan during the 2005–2006. *Veterinary Microbiology*. 2007;124:35–46.
- 10.- Wright PF, Webster RG,. Orthomyxoviruses. In Knipe, D.M., Howley, P.M. (eds.), *Fields Virology*. fourth ed. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, 2001pp. 1533–1579.
- 11.- Lee CW, Senne DA, Suarez DL. Effect of Vaccine Use in the Evolution of Mexican Lineage H5N2 Avian Influenza Virus. *Journal of Virology*. 2004;78:8372-8381.
- 12.- Pachucki CT: Rapid Tests for Influenza. *Current Infectious Disease Reports*. 2005;7:187-192.

- 13.- Fouchier RAM, Bestebroer TM, Herfst S, Van Der Kemp L, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD. Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. *J Clin Microbiol.* 2000;38:4096-4101.
- 14.- Cattoli G, Drago A, Maniero S, Toffan A, Bertoli E, Fassina S, Terregino C, Robbin C, Vicenzoni G, Capua I. Comparison of three rapid detection systems for type A influenza virus on tracheal swabs of experimentally and naturally infected birds. *Avian Pathol.* 2004;33:432-7.
- 15.- Spackman E, Seene DA, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, Lohman K, Danum LT, Suarez DL. Development of a Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A Influenza Virus and the Avian H5 and H7 Hemagglutinin Subtypes. *Journal of Clinical Microbiology.* 2002;40:3256-3260.
- 16.- Bustin SA, Muller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci (Lond).* 2005;109:365-79.
- 17.- Di Trani L, Bendini B, Donatelli I, Campitelli L, Chiappini B, De Marco MA, Delogu M, Buonavoglia C, Vaccari G. A sensitive one-step real-time PCR for detection of avian influenza viruses using a MGB probe and an internal positive control. *BMC Infectious Diseases.* 2006;25:6:87
- 18.- Panda A, Huang Z, Elankumaran S, Rockemann DD, Samal SK. Role of fusion protein cleavage site in the virulence of Newcastle disease virus. *Microbial Pathogenesis.* 2004;36:1-10.
- 19.- Huang Z, Panda A, Elankumaran S, Govindarajan D, Rockemann DD, Samal SK. The hemagglutininneuraminidase protein of Newcastle disease virus determines tropism and virulence. *Journal of Virology.* 2004;78:4176-4184.
- 20.- Piacenti AM, King DJ, Seal BS, Zhan J, Brown CC. Pathogenesis of Newcastle Disease in Commercial and Specific Pathogen-free Turkeys Experimentally Infected with Isolates of Different Virulence. *Vet Pathol.* 2006;43:168–178.
- 21.- Mark G. Wise, David L. Suarez, Bruce S. Seal, Janice C. Pedersen, Dennis A. Senne, Daniel J. King, Darrell R. Kapczynski, and Erica Spackman. Development of a Real-Time Reverse-Transcription PCR for Detection of Newcastle Disease Virus RNA in Clinical Samples. *Journal of Clinical Microbiology.* 2004; 329–338
- 22.- Cavanagh D, Naqi SA, Saif YM (Ed.), *Infectious Bronchitis, Diseases of Poultry.* Iowa State University Press, Ames, IA, 2003.pp. 101–119.

- 23.- Cavanagh D. Coronavirus avian infectioud bronchitis virus. Vet. Res. 2007;38:281-297.
- 24.- Callison SA, Hilt DA, Boynton TO, Sample BF, Robison R, Swayne DE, Jackwood MW. Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens. Journal of Virological Methods. 2006;138:60–65.
- 25.- Gelb JJ, Jackwood MW, Swayne DE, Glisson JR, Pearson JE, Reed WM. Infectious Bronchitis a Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, PA. 1998;169–174.
- 26.- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucore&id=82654878>.
- 27.- Nakamura, S., S. Katamine, T. Yamamoto, S. Foung, T. Kurata, Y. Hirabayashi, K. Shimada, S. Hino, and T. Miyamoto. Amplification and detection of a single molecule of human immunodeficiency virus RNA. Virus Genes. 1993;4:325–338.
- 28.- Malik YS, Patnayak DP, Goyal SM. Detection of three avian respiratory viruses by single-tube multiplex reverse transcription–polymerase chain reaction assay. J Vet Diagn Invest. 2004;16:244–248.
- 29.- Pang Y, Wang H, Girshick T, Xie Z, Khan MI. Development and application of a multiplex polymerase chain reaction for avian respiratory agents. Avian Dis. 2002;46:691-9.
- 30.- Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE. Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology. Clinical Microbiology Reviews. 2000;13:559–570.
- 31.- A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. Pub. The American association of avian pathologists.4° edition 1998.
- 32.- Norma Oficial Mexicana NOM-063-ZOO-1999.
- 33.- Boyle JS, Lew AM. 1995. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. Trends in genetics. 1995;11:8
- 34.- Kelleher CD, Champoux JJ. RNA Degradation and Primer Selection by Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase Contribute to the Accuracy of Plus Strand Initiation. The Journal of Biological Chemistry. 2000; 28:13061–13070.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Técnica de titulación del virus de la enfermedad de Newcastle a partir de líquido alantoideo en embrión de pollo.

Se utilizan 5 embriones libres de patógenos específicos de 9 a 11 días de edad, se revisan en el ovoscopio y se marca el límite de la cámara de aire. También se marca el punto de inoculación, a 2 mm por encima del límite de la cámara de aire. Se identifican los embriones con el número de lote y dilución a inocular. Los embriones se mantienen en incubación hasta su uso. Todo lo anterior se realiza en la campana de flujo laminar.

Al realizar la dilución se utilizan 10 tubos con 9 ml de PBS al 1% mas antibiótico (penicilina G sódica 100,000 U.I./ml y sulfato de estreptomicina 200 mg/ml).

Las diluciones se hacen de la siguiente manera:

- Se coloca 1 ml del líquido alantoideo cosechado en el tubo número uno, con ayuda de una pipeta estéril. Se homogeniza con vortex durante 15 segundos. Posteriormente, con otra pipeta estéril se toma 1ml de la dilución del tubo número uno y se pasa al tubo número dos el cual contiene 9 ml de la mezcla de PBS y antibiótico, se homogeniza con vortex durante 15 segundos, con otra pipeta estéril se toma 1 ml de la dilución y se paso al tubo número 3. Este procedimiento se repite hasta el tubo número diez, entre dilución y dilución se cambia de pipeta.

Realizadas las diluciones se desinfecta la zona a inocular con Yodo al 2% y se perfora el cascarón en el punto de inoculación previamente identificado. Con una jeringa de insulina se toman 0.2 ml de la dilución 10^{-10} y se inoculan por vía cavidad alantoidea a los primeros 5 embriones, la misma operación se efectúa con las diluciones 10^{-9} , 10^{-8} y 10^{-7} . Terminada la inoculación se sella con resistol.

Los embriones se incuban a 37°C durante 72 horas, para verificar mortalidad todos los días se revisan en el ovoscopio. Los embriones muertos durante las primeras 24 horas se descartan, ya que su muerte puede ser causada por traumatismo al momento de la inoculación o por contaminación del embrión.

Pasadas 72 horas de incubación, la presencia del virus se monitorea mediante la prueba de aglutinación en placa, es decir se muestrean todos los embriones muertos a partir de las 48 horas post-inoculación. Los embriones se ponen en refrigeración durante 30 minutos para inducir la muerte embrionaria.

- Pasados los 30 minutos se corta el cascarón a nivel de la cámara de aire, se inicia por la dilución 10^{-10} . De los embriones que sobrevivieron al periodo de incubación se colocan 0.05 ml de líquido alantoideo en una placa de vidrio con ayuda de una jeringa de insulina con aguja de 16 x 25 mm, después se depositan dos gotas de eritrocitos de pollo al 2% en PBS sobre el líquido alantoideo. Se mezcla mediante movimientos oscilatorios suaves durante 10 segundos.

- Pasados los 10 segundos, el resultado se considera como positivo cuando se presenta hemoaglutinación, se observa una aglomeración de eritrocitos o gránulos en la superficie de la placa.

Los resultados se anotan de acuerdo al número de muestras positivas y el número de muestras probadas.

Ejemplo de la obtención del título del líquido alantoideo por medio del método de Reed & Muench:

Dilución	Resultados +/-	Embriones +	Embriones -	Σ+	Σ-	Total	%
10 ⁻¹⁰	0/5	0	5	0	10	0/10	0
10 ⁻⁹	0/5	0	5	0	5	0/5	0
10 ⁻⁸	5/5	5	0	5	0	5/5	100
10 ⁻⁷	5/5	5	0	10	0	10/10	100

En la primera columna se encuentran las diluciones efectuadas, en la segunda columna se encuentra el número de embriones positivos/negativos a la replicación viral. En la tercera columna encontramos a los embriones positivos y en la cuarta a los embriones negativos. En la quinta y sexta columna se encuentra la sumatoria de embriones positivos y negativos, estos últimos resultados se calculan asumiendo que si el huésped inoculado resulta afectado a una dilución determinada, la dilución próxima menor también afecta al huésped ya que aún contiene una concentración menor de virus. Por esta razón el número de embriones positivos sumados se obtiene empezando por la dilución más alta, mientras que el número de embriones negativos sumados se logra empezando por la dilución más baja. Una vez calculadas las sumatorias se calcula el número total de huéspedes inoculados con cada dilución y se obtiene el porcentaje del número de embriones afectados³¹.

Utilizando las cifras de la tabla encontramos que el punto final 50% se encuentra entre las diluciones 10⁻⁸ (100%) y 10⁻⁹ (0%). Para calcular la distancia proporcional se utiliza la siguiente fórmula:

$$Dp = \frac{\% > 50\% - 50}{\% > 50\% - \% < 50\%} = \frac{100 - 50}{100 - 0} = \frac{50}{100} = 0.5$$

Se debe tomar en cuenta el recíproco de la dilución más alta al 50% que es 10⁸, se le suma el resultado de la distancia proporcional y 0.7 (ya que al embrión se le inoculó 0.2 ml, lo que quiere decir que se diluyó 5 veces y el logaritmo de 5 es 0.699 por lo cual se redondea a 0.7) para obtener la concentración final.

$$8 + 0.5 + 0.7 = 9.2$$

Por lo tanto el título que se obtiene en este caso es:

$$10^{9.2} \text{ DIEP}_{50\%}/\text{ml}$$

Cuando la mortalidad de los embriones de cada dilución, así como de los controles es mayor al 20% deberá repetirse la prueba, calificando los resultados como no concluyentes. De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-052-ZOO-1995, "Requisitos mínimos para las vacunas empleadas en la prevención y control

de la enfermedad de Newcastle” el título de la semilla de trabajo no debe ser menor a 10^9 DIEP_{50%}/ml.

Virus de Bronquitis infecciosa

Se utilizan embriones libres de patógenos específicos de 9 a 11 días de edad. La metodología para la titulación del virus de Bronquitis infecciosa es similar a la efectuada para el virus de la enfermedad de Newcastle, las diluciones que se inoculan son: 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} .

La lectura se realiza a las 168 horas (7 días), para ver mortalidad se revisan diariamente los embriones en el ovoscopio. A partir de las 48 horas se extrae el líquido alantoideo de los embriones muertos, se revisan lesiones en el embrión comparándolos con los controles y como prueba adicional a todos los embriones (muertos y vivos) se les debe efectuar la prueba de hemoaglutinación rápida en placa para verificar que no estén contaminados por algún tipo de virus hemoaglutinante.

Posteriormente a los embriones que sobrevivieron se ponen en refrigeración durante 30 minutos para inducir la muerte del embrión, con ayuda de unas pinzas se les corta el cascarón eliminando las membranas y fluidos embrionarios para extraer el embrión, estos se colocan sobre una cubierta plastificada formando por cada dilución una hilera.

Se consideraron positivos aquellos embriones que presenten las siguientes lesiones diferentes al control negativo:

- ✓ Enanismo
- ✓ Enroscados o en forma de ovillo
- ✓ Malformaciones en extremidades
- ✓ Hemorragias
- ✓ Muerte dentro de un periodo de 2 a 7 días de incubación posterior a su inoculación.

Los embriones muertos 24 horas posteriores a la inoculación son contabilizados como positivos solo si resultan negativos a la presencia de virus hemoaglutinantes.

Cuando la mortalidad de los embriones de cada dilución, así como de los testigos es mayor al 20% la prueba debe repetirse y reportar los resultados como no concluyentes.

Ejemplo de la obtención del título del líquido alantoideo de BI por medio del método de Reed & Muench:

Dilución	Resultados	Embriones		$\Sigma+$	$\Sigma-$	Total	%
	+/-	+	-				
10^{-8}	1/5	1	4	1	6	1/6	16
10^{-7}	3/5	3	2	4	2	4/6	66
10^{-6}	5/5	5	0	9	0	9/9	100
10^{-5}	5/5	5	0	14	0	14/14	100

En la primer columna se encuentran las diluciones efectuadas, en la segunda columna se encuentra el número de embriones positivos/negativos a la

replicación viral. En la tercer columna encontramos a los embriones positivos y en la cuarta a los embriones negativos. En la quinta y sexta columna se encuentra la sumatoria de embriones positivos y negativos, estos últimos resultados se calculan asumiendo que si el huésped inoculado resulta afectado a una dilución determinada, la dilución próxima menor también afecta al huésped ya que aún contiene una concentración menor de virus. Por esta razón el número de embriones positivos sumados se obtiene empezando por la dilución más alta, mientras que el número de embriones negativos sumados se logra empezando por la dilución más baja. Una vez calculadas las sumatorias se calcula el número total de huéspedes inoculados con cada dilución y se obtiene el porcentaje del número de embriones afectados³¹.

Utilizando las cifras de la tabla encontramos que el punto final 50% se encuentra entre las diluciones 10^{-7} (66%) y 10^{-8} (16%). Para calcular la distancia proporcional se utiliza la siguiente fórmula:

$$DP = \frac{\% > 50\% - 50}{\% > 50\% - \% < 50\%} = \frac{66 - 50}{66 - 16} = \frac{16}{50} = 0.32$$

Tomamos en cuenta el recíproco de la dilución más alta al 50% que es 10^7 , a este se le suma el resultado de la distancia proporcional y 0.7 para obtener la concentración final.

$$7 + 0.32 + 0.7 = 8.02$$

Por lo tanto, el título que se obtiene es:

$$10^{8.02} \text{ DIEP}_{50\%}/\text{ml}$$

El título por parte de algunas empresas de biológicos es de 10^8 $\text{DIEP}_{50\%}/\text{ml}$. La Norma Oficial Mexicana NOM-063-ZOO-1999 en el Apéndice A (normativo) dice que "Para efectos de comprobación, el fabricante y/o titular del producto debe asegurar el grado de protección y título mínimo de 10^4 $\text{DIEP}_{50\%}/\text{ml}$ ³².

Anexo 2. Extracción de ARN Viral a partir de líquido alantoideo.

Se mezclan 500µl de líquido alantoideo con 1000 µl de trizol®, se incuba en hielo por 10 minutos, se agregan 200µl de cloroformo y se agita en vortex por 15 segundos. Se centrifuga a 11,000 g (Centrifuga Beckman Coulter, Allegra 25R) durante 15 minutos y se recupera la fase acuosa a la que se le agrega 1 volumen de isopropanol frío. Se incuba a -20°C por 30 minutos; se centrifuga a 11,000 g durante 15 minutos, se descarta el sobrenadante y se lava la pastilla con 500 µl de etanol al 70% DEPC frío. Se centrifuga a 11000g durante 15 minutos, se descarta el sobrenadante y se seca la pastilla en el speedvac (Heto Lab Equipment) en vacío a temperatura ambiente. La pastilla se resuspende en 20 µl de agua DEPC y se congela a -80°C hasta su utilización.

Anexo 3. Condiciones de Transcripción Reversa (RT).

Reactivo	µl	Temperatura y tiempo
RNA	7	70°C por 5 minutos
Primer 50pmol	2	
H ₂ O DEPC	2	
Buffer comercial 5X (Fermentas)	4	4°C por 5 minutos
d´NTP´s 10mM	2	
RNAse OUT 40U/ul (Fermentas)	0.5	
H ₂ O DEPC	1.5	
Transcriptasa reversa. (SuperScript™ II RNase H-Reverse Transcriptase invitrogen catalogo # 185064-014)	1	37°C por 5 minutos
Vol. Final cbp.	20	42°C por 1 hora
		70°C por 10 minutos

Anexo 4. Condiciones de PCR Punto Final para la amplificación de los segmentos controles de la PCR-TR (fragmento de 101pb de IA, fragmento de 121pb para EN y el fragmento de 143 pb de BI)

Reactivo	Stock	Final	1rx
H ₂ O	----	cbp 20µl	10.6µl
Buffer Taq comercial	10x	1x	2µl
MgCl ₂	30mM	1.5mM	1µl
d´NTP´s	2mM	0.2mM	2µl
Iniciadores c/u	10µM	0.5µM	1µl
Taq Pol	5u/µl	2u/rx	0.4µl
cDNA	----	3µl	3µl

Condiciones de amplificación empleadas: temperatura inicial de desnaturalización 94°C –5', 30 ciclos de 94°C—30", 60°C—30", 72°C—1', y una extensión final de 72°C por 15'.

Anexo 5. Purificación de fragmentos de ADN a partir de gel de agarosa

Realizar la electroforesis del producto a purificar en gel de agarosa-TAE 1% y 3%.

Recortar la banda con ayuda de un transiluminador.

Pesar el fragmento y adicionar 3 volúmenes (1g gel=1ml) de yoduro de sodio 6M.

Incubar 5-10 min a 55°C, o hasta que la agarosa se disuelva.

Adicionar 15 µl de perlas de sílica, incubar 30-60 min a 4 °C.

Centrifugar 4 min/12,000 rpm/4°C.

Decantar y resuspender la pastilla con 500 µl de solución de lavado, centrifugar 4 min/12,000 rpm/4°C. Repetir una vez mas este paso.

Decantar, secar la pastilla por calor

Resuspender en 30 µl de agua bidestilada estéril, incubar 55°C/5 min.

Centrifugar 12,000 rpm/4 min/temperatura ambiente.

Recuperar el sobrenadante en un tubo limpio.

Visualizar 5 µl de la purificación en un gel de agarosa.

Solución de lavado: NaCl 50mM, Tris HCl pH7.5 10mM, EDTA 2.5mM, etanol 50% v/v.

Perlas de sílica: Preparar una suspensión de sílica a 100 mg/ml en PBS, centrifugar 2 min/2,000g. Resuspender la pastilla a una concentración final de 100 mg/ml en NaI 3M. Alicuotar en volúmenes de 500 ul y cubrir de la luz con papel aluminio. Refrigerar³³.

Anexo 6. Ligación de productos de PCR a plásmidos

Plasmido pTZ57R/T (Fermentas, No catalogo K1214)

Reactivo	Stock	Final	1rx
Vector	55ng/μl	55ng	1μl
Inserto	Fragmento purificado del gen M del virus de Influenza Aviar	--	1μ
T4 ADN lig	5u/μl	2.5u/rx	0.5μl
Buffer	5x	1x	2μl
H ₂ O	--	cpb. 10μl	5.5μ

Plasmido pJET1.2/blunt (Fermentas, No catalogo #K1231, #K1232)

Componente	Volumen
2X buffer	10 μl
Producto PCR (Fragmentos purificados de gen M del virus de Newcastle ó 5'-UTR del virus de Bronquitis Infecciosa Aviar).	5 μl
H ₂ O libre de nucleasas	c.b.p. 17 μl
ADN blunting enzyme	1 μl
Total	18 μl

Incubar la mezcla a 70°C por 5 minutos. Enfriar brevemente en hielo.

Enseguida adicionar

componente	volumen
pJET1.2/blunt coning vector (50ng/ml)	1 μl
T4 DNA ligase (5u/μl)	1 μl
total	20

Incubar la mezcla a temperatura ambiente (22°C) por 5 minutos. La incubación puede ser extendida hasta 30 minutos si se requiere el máximo número de ligación.

Usar directamente el producto de ligación para transformar bacterias.

Anexo 7. Transformación bacteriana

Mezclar 100 µl de células competentes con 30-50 ng de DNA (del vector posterior a la reacción de ligación).

Incubar 30min/4°C. Incubar 1min/42°C. Incubar 2 min/4°C. Adicionar LB cbp 1 ml. Incubar 1h/37°C/100-120 rpm.

Espatular en medio apropiado (LB/ampicilina) de 100-500 µl de células transformadas.

PREPARACION DE CELULAS COMPETENTES DH 10B.

Sembrar para aislar una colonia de la cepa *E. coli* DH 10b (o la que se vaya a utilizar) en una placa de LB agar, incubar de 24 a 48 hrs a 37 °C.

Tomar una colonia aislada y sembrarla en 5 ml de LB, incubar por 2hrs/37 °C, en agitación constante (300 rpm).

Expandir el cultivo en 100 ml de LB e incubar nuevamente a 37°C a 300 rpm hasta obtener una OD₅₅₀ de 0.5 (aprox. 3 hrs).

Alicuotar el cultivo en 2 tubos falcon de 50 ml. Centrifugar a 2,500 rpm por 5 min a 4°C. El material es decantado y cada pastilla es resuspendida en 30 ml de Tfb I con ayuda de un vortex. Las suspensiones son incubadas en hielo. La eficiencia de transformación depende del tiempo de incubación:

TIEMPO DE INCUBACION (min)	EFICIENCIA (Transf./µg DE DNA)
30	1.0 x 10 ⁷
60	1.52 x 10 ⁷
90	1.18 x 10 ⁷

Las células transformadas son centrifugadas a 2,000 rpm por cinco minutos a 4 °C.

El sobrenadante es decantado y las pastillas son resuspendidas cuidadosamente en 3 ml de Tfb II (1 ml de Tfb II por cada 10 ml de Tfb I utilizado en el paso 5).

Finalmente la suspensión es alicuotada (200 µl) en tubos eppendorf de 1.5 ml, inmediatamente se introducen destapados en nitrógeno líquido.

El nitrógeno es decantado, los tubos se cierran y se almacenan a -70 °C.

SOLUCIONES REQUERIDAS:

Tfb I pH 5.8 (500ml)

1.47 g Kac (30mM)

4.95 g MnCl₂

3.73 g KCl (100mM)

0.74 g CaCl₂ (13.3 mM)

60 ml Glicerina (12%)

Disolver en agua todos los compuestos, ajustar el pH a 5.8 con ácido acético 0.2M y esterilizar por filtración, finalmente almacenar siempre a 4 °C.

Tfb II (500ml)

10.47g MOPS (disolverlo en 300 ml de agua destilada, ajustar el pH a 7 con NaOH 10M y en seguida adicionar los demás componentes).

5.51 de CaCl₂ (100mM)

0.37 g KCl (10mM)

60 ml Glicerina

H₂O cbp 500 ml

Incorporar al MOPS ya disuelto, los demás componentes, esterilizarlo por filtración y almacenar a 4 °C. Es importante que el CaCl₂ y el KCl se adicionen en forma de solución, para evitar su precipitación.

Anexo 8. Purificación de plásmidos

Se usó el kit QIAfilter Plasmid Midi Kit (Cat #: 12243) de Quiagen siguiendo las instrucciones del fabricante:

Antes de empezar se añade la RNasa A (concentración final 100 µg/ml al Buffer P1.

Verificar que el Buffer P2 no se haya presipitado. De ser necesario calentar a 37°C

Enfriar el Buffer P3 a 4°C.

- 1.- Tomar una colonia e inocularla en 2-5ml de medio de cultivo LB ampicilina. Incubar por 8horas a 37°C a 300 rpm.
 - 2.- Diluir el cultivo 1/500 o 1/1000 en medio LB ampicilina. Para plasmidos con altonumero de copias inocular 25 ml de mesio con 25-50 µl del medio inicial. Para plasmidos con bajo numero de copias inocular 50-100 ml del medio con 100-200µl del medio inicial. Crecer a 37°C por 12-16 horas a 300 rpm.
 - 3.- Centrifugar el medio (2.5 L) a 6000g por 15minutos a 4°C.
 - 4.- Resuspender el pelet de bacterias en 4ml del buffer P1.
 - 5.- Añadir 4ml del buffer P2, mezclar vigorosamente con inversiones de 4-6 tiempos. No utilizar vortex. Incubar a temperatura ambiente (15-25°C) por 5 minutos.
 - 6.- Añadir 4ml del buffer P3 frio.
 - 7.- Colocar el lisado dentro del filtro (QIAfilter Cartridge). Incubar a temperatura ambiente (15-25°C) por 10 minutos. No colocar the plunger Plasmid Midi KITS.
 - 8.- Equilibrar un QIAGEN-tip 100 mediante la adición de 4ml de buffer QBT, y permitir que fluya por gravitacion.
 - 9.- Remover la capucha del QIAfilter Cartridge outlet nozzle. Suvemente incertar el embolo dentro de QIAfilter Midi y filtrar el lisado celular dentro del previamente equilibrado QIAGEN-tip. Aproximadamente 10ml del lisado se recuperaran.
- Remover 240µl como muestra del filtrado del lisado para analizarla posteriormente en un gel de agarosa (muestra 1).
- 10.- Permitir que el lisado fluya por el filtro. Tomar 240µl del filtrado para analizarlo posteriormente en un gel de agarosa (muestra 2).

11.- Lavar el QIAGEN-tip con 2 x 10ml del buffer QC. Tomar 400µl del filtrado para analizarlo posteriormente en un gel de agarosa (muestra 3).

12.- Eluir al ADN con 5ml de buffer QF. Tomar 100µl del eluido para analizarlo posteriormente en un gel de agarosa (muestra 4).

13.- Precipitar el ADN añadiendo 3.5ml (0.7volumenes) de isopropanol a temperatura ambiente al ADN eluido. Centrifugar a 5000g por 60 minutos a 4°C.

14.- Lavar el pellet de ADN con 2 ml de etanol al 70% a temperatura ambiente, centrifugar a 5000g por 60 minutos a 4°C.

15.- Aplicar aire caliente al pelet por 5-10 minutos para secar. Resuspender el ADN en 500µl.

Anexo 9. Cuantificación de ADN de los plásmidos

Se emplea el protocolo del kit Quant-iT PicoGreen dsDNA Reagent and Kits (Invitrogene catalogo # P11496), que emplea el colorante fluorescente PicoGreen.

1. Identificación de los reactivos

Material	Amount	Concentration	Storage	Stability
Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA reagent (Component A)	1 mL in 1 vial (P7589) or in 10 vials of 100 µL each (P11496)	Solution in DMSO	<ul style="list-style-type: none"> • ≤-20°C • Desiccate • Protect from light 	When stored as directed, product stable for at least 6 months
20X TE (Component B)	25 mL	200 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 7.5	• Room temperature *	
Lambda DNA standard (Component C)	1 mL	100 µg/mL in TE	• 2-6°C *	

* For long-term storage, both the 20X TE and lambda DNA standard can be stored at ≤-20°C.

Number of Labelings: For either the kits or the stand-alone reagent, sufficient reagent is supplied for 200 assays using an assay volume of 2 mL and the protocol described below. Note that the assay volume is dependent on the instrument used to measure fluorescence; with a microplate reader and a 96-well microplate, the assay volume is reduced to 200 µL and 2,000 assays are possible.

Spectral Data: Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA reagent 502/523 nm, bound to nucleic acids

2. Preparar los reactivos

1.- Quant-iT PicoGreen dsDNA reactivo (componente A) hacer una dilución 1 en 200

2.- TE 20X (componente B) concentración final 1X.

3.- Lambda DNA estándar 100µg/mL en TE (componente C) diluir a una concentración final 2000 ng/mL.

2.1. Se realiza en un volumen que cubra los requerimientos de la curva y el número de las muestras que se analicen.

3. Elaboración de la curva estándar por duplicado con 8 puntos como se muestra en el siguiente cuadro.

ADN (2mg/ml)	TE 1X	PicoGreen (1:200)	Vol. final	Concen ADN
10 µl	0 µl	10 µl	20 µl	1000 ng/ml
8 µl	2 µl	10 µl	20 µl	800 ng/ml
6 µl	4 µl	10 µl	20 µl	600 ng/ml
4 µl	6 µl	10 µl	20 µl	400 ng/ml
2 µl (10 µl 1:5)	8 µl (0 µl)	10 µl	20 µl	200 ng/ml
1 µl (10 µl 1:10)	9 µl (0 µl)	10 µl	20 µl	100 ng/ml
0.5µl (5 µl 1:10)	9.5 µl (5 µl)	10 µl	20 µl	50 ng/ml
0 µl	10	10 µl	20 µl	0 ng/ml

4. Evaluación de las muestras problema

La evaluación se realiza en dos pasos: primero buscando encontrar la dilución apropiada que caiga dentro de la curva estándar, se realizan entre tres y cuatro diluciones decuples seriadas. Cada punto se incluye por duplicado. Segundo una vez identificada la dilución adecuada, se incluyen diferentes volúmenes de ésta dilución por duplicado.

Ejemplo: paso 1, diluciones decuples seriadas.

ADN muestra	TE 1X	PicoGreen (1:200)	Vol. final
10µl (1:10)	0 µl	10 µl	20 µl
10µl (1:100)	0 µl	10 µl	20 µl
10µl (1:1000)	0 µl	10 µl	20 µl

Paso 2, inclusion de diferentes volúmenes de la dilución adecuada de cada plásmido, por duplicado.

ADN muestra	TE 1X	PicoGreen (1:200)	Vol. final
10µl (1:100)	0 µl	10 µl	20 µl
5µl (1:100)	5 µl	10 µl	20 µl

Se ajusta cada valor a su respectiva dilución y se saca un promedio de los mismos para obtener el valor de cada plásmido

Una vez obtenida la cantidad de masa por unidad de volumen se realiza el cálculo del número de copias. Este cálculo está basado en la suposición del promedio del peso de un par de bases (pb) que es de 650 Daltons. Esto significa que un mol de pb pesa 650 g y el peso molecular de cualquier cadena doble de ADN puede ser estimado tomando el producto en longitud y peso. El inverso del peso molecular es el número de moles del templado presente en 1 g de material. Usando el número de Avogadro, 6.022×10^{23} moléculas/mol el número de moléculas del templado por gramo puede ser calculado.

$$\text{Mol/g} * \text{molécula/mol} = \text{moléculas/g}$$

Finalmente el número de moléculas o número de copias del templado en la muestra puede ser estimado multiplicando por 1×10^9 para convertir a ng y entonces multiplicar por la cantidad del templado (en ng).

$$\text{Número de copias} = (\text{ng} * 6.022 \times 10^{23}) / (\text{pb} * 1 \times 10^9 * 650)$$

Anexo 10. Determinación del límite de sensibilidad de amplificación para los plásmidos pIAMT, pJETENM y pJETBI5’.

Con el ADN de cada plásmido cuantificado se realizaron 10 diluciones decuples seriadas para identificar el número menor de moléculas detectables mediante PCR-TR. En los cuadros A10.1, A10.2 y A10.3 se muestran las diluciones realizadas, indicando las concentraciones de ADN y el número de copias del plásmido evaluadas por reacción. Los ensayos se realizaron en volúmenes de 20 µl conteniendo una dilución inicial de 1/10 del ADN del plásmido originalmente purificado.

Cuadro A10.1. Diluciones decuples seriadas del plásmido pIAMT. Se observa la dilución del plásmido, la concentración de ADN en cada dilución expresada en ng, pg y el número de copias del plásmido por µl.

PIAMT	dilucion	Concentración del plásmido ng/µl/20ul Rx	pg/µl	No de copias del plásmido /µl	No de copias del plásmido /µl
1µl:10 (10µl de 1:100)	1:10	14.4	14400	3640000000	1 X 10 ⁹⁻⁵⁶¹
1µ 1:100 (10µl de 1:1000)	1:100	1.44	1440	364000000	1 X 10 ⁸⁻⁵⁶¹
1µ 1:1000 (10µl de 1:10000)	1:1000	0.144	144	36400000	1 X 10 ⁷⁻⁵⁶¹
1µ 1:10000 (10µl de 1:100000)	1:10000	0.0144	14.4	3640000	1 X 10 ⁶⁻⁵⁶¹
1µ 1:100000 (10µl de 1:1000000)	1:100000	0.00144	1.44	364000	1 X 10 ⁵⁻⁵⁶¹
1µ 1:1000000 (10µl de 1:10000000)	1:1000000	0.000144	0.144	36400	1 X 10 ⁴⁻⁵⁶¹
1µ 1:10000000 (10µl de 1:100000000)	1:10000000	0.0000144	0.0144	3640	1 X 10 ³⁻⁵⁶¹
1µ 1:100000000 (10µl de 1:1000000000)	1:100000000	0.00000144	0.00144	364	1 X 10 ²⁻⁵⁶¹
1µ 1:1000000000 (10µl de 1:10000000000)	1:1000000000	0.000000144	0.000144	36	1 X 10 ¹⁻⁵⁶¹
1µ 1:10000000000 (10µl de 1:100000000000)	1:10000000000	0.0000000144	0.0000144	3	1 X 10 ⁰⁻⁵⁶¹

Cuadro A10.2. Diluciones decuples seriadas del plásmido pJETENM. Se observa la dilución la concentración de cada dilución en ng, pg y número de copias por μl .

pJETENM (dilucion)	dilicion	ng/ μl	pg/ μl	copias/ μl	Copias/ μl
1 μ 1:10 (10 μl de 1:100)	1:10	61.4	61400	18400000000	1 X 10 ¹⁰⁻²⁶⁵
1 μ 1:100 (10 μl de 1:1000)	1:100	6.14	6140	1840000000	1 X 10 ⁹⁻²⁶⁵
1 μ 1:1000 (10 μl de 1:10000)	1:1000	0.614	614	184000000	1 X 10 ⁸⁻²⁶⁵
1 μ 1:10000 (10 μl de 1:100000)	1:10000	0.0614	61.4	18400000	1 X 10 ⁷⁻²⁶⁵
1 μ 1:100000 (10 μl de 1:1000000)	1:100000	0.00614	6.14	1840000	1 X 10 ⁶⁻²⁶⁵
1 μ 1:1000000 (10 μl de 1:10000000)	1:1000000	0.000614	0.614	184000	1 X 10 ⁵⁻²⁶⁵
1 μ 1:10000000 (10 μl de 1:100000000)	1:10000000	0.0000614	0.0614	18400	1 X 10 ⁴⁻²⁶⁵
1 μ 1:100000000 (10 μl de 1:1000000000)	1:100000000	0.00000614	0.00614	1840	1 X 10 ³⁻²⁶⁵
1 μ 1:1000000000 (10 μl de 1:10000000000)	1:1000000000	0.000000614	0.000614	184	1 X 10 ²⁻²⁶⁵
1 μ 1:10000000000 (10 μl de 1:100000000000)	1:10000000000	0.0000000614	0.0000614	18	1 X 10 ¹⁻²⁶⁵

Cuadro A10.3. Diluciones decuples seriadas del plásmido PJETBI5'. Se observa la dilución la concentración de cada dilución en ng, pg y número de copias por μl .

PJETBI5' (dilucion)	dilicion	ng/ μl	pg/ μl	copias/ μl	Copias/ μl
1 μ 1:10 (10 μl de 1:100)	1:10	125.7	125700	37400000000	1 X 10 ¹⁰⁻⁵⁷³
1 μ 1:100 (10 μl de 1:1000)	1:100	12.57	12570	3740000000	1 X 10 ⁹⁻⁵⁷³
1 μ 1:1000 (10 μl de 1:10000)	1:1000	1.257	1257	374000000	1 X 10 ⁸⁻⁵⁷³
1 μ 1:10000 (10 μl de 1:100000)	1:10000	0.1257	125.7	37400000	1 X 10 ⁷⁻⁵⁷³
1 μ 1:100000 (10 μl de 1:1000000)	1:100000	0.01257	12.57	3740000	1 X 10 ⁶⁻⁵⁷³
1 μ 1:1000000 (10 μl de 1:10000000)	1:1000000	0.001257	1.257	374000	1 X 10 ⁵⁻⁵⁷³
1 μ 1:10000000 (10 μl de 1:100000000)	1:10000000	0.0001257	0.1257	37400	1 X 10 ⁴⁻⁵⁷³
1 μ 1:100000000 (10 μl de 1:1000000000)	1:100000000	0.00001257	0.01257	3740	1 X 10 ³⁻⁵⁷³
1 μ 1:1000000000 (10 μl de 1:10000000000)	1:1000000000	0.000001257	0.001257	374	1 X 10 ²⁻⁵⁷³
1 μ 1:10000000000 (10 μl de 1:100000000000)	1:10000000000	0.0000001257	0.0001257	37	1 X 10 ¹⁻⁵⁷³

Anexo 11. Reproducibilidad

Con la información obtenida de los experimentos de sensibilidad se construyó una curva estándar con el plásmido pIAMT incluyendo seis puntos ($1 \times 10^{9.5}$, $1 \times 10^{8.5}$, $1 \times 10^{7.5}$, $1 \times 10^{6.5}$, $1 \times 10^{5.5}$ y $1 \times 10^{4.5}$ copias) por triplicado, para cuantificar cDNA del virus de Influenza Aviar. Se construyó una curva estándar con el plásmido pJETENM incluyendo seis puntos ($1 \times 10^{10.2}$, $1 \times 10^{9.2}$, $1 \times 10^{8.2}$, $1 \times 10^{7.2}$, $1 \times 10^{6.2}$ y $1 \times 10^{5.2}$) para cuantificar cDNA del virus de Enfermedad de Newcastle. También se construyó una curva estándar con el plásmido pJETBI5' incluyendo seis puntos ($1 \times 10^{9.5}$, $1 \times 10^{8.5}$, $1 \times 10^{7.5}$, $1 \times 10^{6.5}$, $1 \times 10^{5.5}$ y $1 \times 10^{4.5}$) para cuantificar cDNA del virus de Bronquitis Infecciosa Aviar.

Se realizaron tres experimentos independientes para cuantificar cDNA de cada virus mediante PCR-TR, utilizando las mismas condiciones y la misma muestra para observar la reproducibilidad de los resultados.

Se purificó el ARN a partir de 500µl de líquido alantoideo de cada virus. Se sintetizó el cDNA de cada purificado. Se realizaron cuatro diluciones decuples seriadas del cDNA de cada virus y se incluyeron 10µl de cada dilución por triplicado en cada experimento, se obtuvo el número promedio de copias por ml de líquido alantoideo de cada virus, para evaluar la reproducibilidad de los ensayos.

Estimates of Covariance Parameters(a)								
virus	Parameter		Estimate	Std. Error	Wald Z	Sig.	95% Confidence Interval	
							Lower Bound	Upper Bound
BI	Residual		600336746303996000	2.83E+17	2.1213	0.0339	2.38E+17	1.51E+18
	expr	Variance	29447168725591800000	2.42E+19	1.2185	0.223	5.9E+18	1.47E+20
EN	Residual		7180286225205920000	4.15E+18	1.7321	0.0833	2.32E+18	2.23E+19
	expr	Variance	214406184466320000000	1.77E+20	1.2112	0.2258	4.25E+19	1.08E+21
IA	Residual		4236628687956370000	2E+18	2.1213	0.0339	1.68E+18	1.07E+19
	expr	Variance	250110033801631000000	2.05E+20	1.2196	0.2226	5.01E+19	1.25E+21
a	Dependent Variable: lectura.							
		BI	0.980020413					
		EN	0.967596008					
		IA	0.983343093					