

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotechnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotechnológica



**DESARROLLO DE UNA PRUEBA RT-PCR CON *PRIMERS* ESPECIFICOS-
DEGENERADOS DISEÑADOS PARA INCREMENTAR LA SENSIBILIDAD DE
LAS PCRs DE DIAGNOSTICO Y SECUENCIACION DE AVIBIRNAVIRUS**

Tesis presentada por el Bachiller:

Pola Romero, Leidy Judith

para optar el Título Profesional de:

Ingeniero Biotecnólogo

Asesora:

Mg. López Álvarez, Natalia

Co-Asesora:

Mg. Zavaleta Apestegui, Milagros

AREQUIPA – PERÚ

2019

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°. 2018000020139
N° Trámite en Fac. 382-2018
Fecha Recep. Fac. 23-04-2018

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

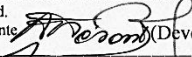
DE: **POLA ROMERO, Leidy Judith**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

"DESARROLLO DE UNA PRUEBA RT-PCR UNIVERSAL PARA ABIVIRNAVIRUS CON PRIMERS ESPECIFICOS-DEGENERADOS DISEÑADOS PARA INCREMENTAR LA SENSIBILIDAD DEL PCR DE DIAGNOSTICO Y SECUENCIACION DE IBDV"

DICTAMINADORES: **Blgo. Carlos Paz Aliaga** 2) **Dra. Milagro Terán Dianderas**

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que, hechas las observaciones y subsanadas las correcciones, sugerimos que el título debe cambiar a: **"DESARROLLO DE UNA PRUEBA RT-PCR UNIVERSAL PARA AVIBIRNAVIRUS CON PRIMERS ESPECIFICOS-DEGENERADOS DISEÑADOS PARA INCREMENTAR LA SENSIBILIDAD DEL PCR DE DIAGNOSTICO Y SECUENCIACION DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD INFECCIOSA DE LA BURSA"**, después de lo cual consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

FIRMA:  (Devolver antes de 8 días hábiles) FECHA **02. Mayo 2018**

ASESOR: **Mgter. Natalia López Álvarez**

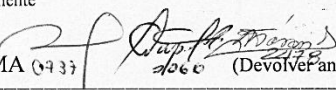
DICTAMEN ASESORÍA: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesora del trabajo de investigación presentado por el recurrente, tengo a bien informar que luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes y debiendo cambiar el título a: **"DESARROLLO DE UNA PRUEBA RT-PCR CON PRIMERS ESPECIFICOS-DEGENERADOS DISEÑADOS PARA INCREMENTAR LA SENSIBILIDAD DE LAS PCRS DE DIAGNOSTICO Y SECUENCIACION DE AVIBIRNAVIRUS"**, considero que el presente trabajo está APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad

FIRMA:  FECHA **29/10/2019**

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) **Blgo Carlos Eitel Iván Paz Aliaga** 3) **Mgter. José Carpio Carpio**
2) **Dra. Milagro Terán Dianderas**

DICTAMEN FINAL: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, es que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

FIRMA:  (Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA **25/11/2019**

JURADOS: PRESIDENTE **MAg. CARLOS JUAN PAZ ALIAGA**
VOCAL **DRA. MILAGRO TERÁN DIANDERAS**
SECRETARIO **MAg. JOSE CARIPO CARIPO**

FECHA **12/12/19** HORA **19.00** LOCAL **C-402**

FIRMA DEL DECANO

FECHA **03 DIC 2019**



AGRADECIMIENTO

A Dios, por cuidarme, guiarme, fortalecer mi fe y estar presente en todo momento.

A mis padres, por el amor, comprensión y apoyo para cumplir mis metas en cada etapa de mi vida.

A la Universidad Católica de Santa María por plasmar en mí los conocimientos y valores necesarios para formarme como profesional y como persona.

A BTS consultores S.A.C. por brindarme la confianza para formar parte de su equipo de investigación, por impulsarme a crecer como profesional y por financiar el proyecto de investigación.

A mi asesora y co-asesora de tesis por su amistad, paciencia y por compartir conmigo sus conocimientos que fortalecieron mi formación e hicieron posible la realización de este proyecto de tesis.

A todas las personas del laboratorio de Epidemiología Molecular y Genética del CITBM por su amistad, consejos y guía en el proceso de elaboración de mi tesis.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTO	ii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUCCIÓN	xii
OBJETIVOS	xiii
Objetivo general	xiii
Objetivos específicos	xiii
HIPÓTESIS	xiv
CAPÍTULO I	1
1. MARCO TEÓRICO	1
1.1. La enfermedad de la bursitis infecciosa	1
1.1.1. Etiología.....	1
1.1.2. Patología y signos clínicos.....	1
1.1.3. Propagación.....	3
1.1.4. Reseña histórica de incidencias	3
1.1.5. Control y prevención.....	3
1.2. Virus de la enfermedad infecciosa de la bursa	4
1.3. Métodos convencionales de detección de IBDV.....	7
1.4. Extracción de ARN	7
1.4.1. Extracción basada en columna de afinidad.....	8
1.4.2. Método de extracción con Genezol.....	9
1.5. La reacción en cadena de la polimerasa	9
1.5.1. Transcripción inversa.....	10
1.5.2. RT-qPCR.....	12
CAPÍTULO II	13

2. MATERIALES Y MÉTODOS	13
2.1. Lugar de ejecución	13
2.1.1. Descripción del laboratorio.....	13
2.2. Materiales	13
2.2.1. Muestras.....	13
2.2.2. Kits.....	13
2.2.3. Equipos	14
2.2.4. Reactivos.....	14
2.2.5. Materiales de vidrio y otros	15
2.3. Métodos.....	15
2.3.1. Diseño de <i>primers</i> específicos-degenerados para IBDV	15
2.3.2. Obtención de ARN viral de IBDV	18
2.3.3. Optimización de la RT-PCR para detección de IBDV	20
2.3.4. Optimización de la RT-PCR para secuenciación de IBDV	22
2.3.5. Electroforesis	25
CAPÍTULO III	26
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
3.1. Diseño de <i>primers</i> específicos-degenerados para IBDV.....	26
3.2. Análisis <i>in silico</i> de <i>primers</i> específicos – degenerados	27
3.3. Cuantificación de ARN por espectrofotometría.....	28
3.4. RT-qPCR para la comparación de métodos de extracción de ARN	30
3.5. Comparación de enzimas de transcripción inversa y uso de DMSO	31
3.6. Comparación entre <i>primers</i> específicos-degenerados y hexámeros aleatorios.	32
3.7. RT-PCR para la secuenciación parcial del segmento A con muestras de bursas positivas para IBDV	34
3.8. RT-PCR para la secuenciación Parcial del segmento B con muestras de	

bursas positivas para IBDV	35
CONCLUSIONES	37
RECOMENDACIONES	38
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
ANEXOS.....	44



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Primers específicos – degenerados de longitud corta	17
Tabla 2.- Primers específicos – degenerados de longitud normal	17
Tabla 3.- Secuencias de primers de detección de IBDV(53).....	21
Tabla 4.- Protocolo de amplificación de la RT-qPCR para detección de IBDV	21
Tabla 5.- Protocolo de amplificación de la PCR de detección de IBDV	22
Tabla 6.- Secuencias de primers de secuenciación de IBDV	24
Tabla 7.- Protocolo de amplificación de la PCR de secuenciación parcial del segmento A y B.....	24
Tabla 8. Análisis de parámetros de primers específicos–degenerados de longitud corta...	27
Tabla 9. Análisis de parámetros de primers específicos – degenerados de longitud entre 18 a 21 pares	28
Tabla 10. Cuantificación de ARN por NanoDrop One	29
Tabla 11.- Datos de análisis de qPCR de detección comparando métodos de extracción ..	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del virus de la enfermedad infecciosa de la bursa (23).....	5
Figura 2. Marcos de lectura del segmento A y B (23).....	5
Figura 3. Alineamiento de secuencias blanco de IBDV en el programa Mega 7.0 (foto propia).....	16
Figura 4. Primers específico - degenerados anclados en el segmento A.....	26
Figura 5. Primers específico - degenerados anclados en el segmento B	26
Figura 6. Curva estandar (10^4 - 10^6) de la RT-qPCR de detección de IBDV. Se muestran valores del coeficiente de correlación (R^2), el intercepto (B) y la eficiencia (E)	30
Figura 7. Curva de amplificación de la RT-qPCR de detección de IBDV	30
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de RT-PCR de detección de IBDV comparando enzimas retro-transcriptasas (AMV y M-MuLV) y uso de DMSO en la desnaturalización de ARN.....	32
Figura 9. Comparación de primers específicos-degenerados y hexámeros aleatorios mediante RT-PCR detección de IBDV.....	33
Figura 10. Comparación de primers específicos degenerados y hexámeros aleatorios mediante RT-PCR de secuenciación parcial del segmento A de IBDV	33
Figura 11. RT-PCR dos pasos y PCR secuenciación parcial del segmento A de muestras positivas de IBDV.	34
Figura 12. RT-PCR dos pasos y PCR secuenciación parcial del segmento B de muestras positivas de IBDV.	35

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNc: Ácido Desoxirribonucleico complementario

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNbc: ARN de doble cadena

BLAST: Herramienta Básica de Búsqueda de Alineamientos locales

BLASTx: Herramienta Básica de Búsqueda de Alineamientos locales, para el análisis de aminoácidos traducidos de una cadena de ADN.

CDS: Secuencia codificante de ADN

DMSO: Dimetil sulfóxido

IBDV: Virus de la Bursitis Infecciosa del inglés Infectious Bursal disease virus

NCBI: Del inglés National Center for Biotechnology Information

PCR: Reacción en cadena de polimerasa

R.H: Random Hexamers

RT-PCR: Transcripción Reversa-PCR



RESUMEN

La enfermedad infecciosa de la bursa (o enfermedad de Gumboro) afecta a nuestro país causando grandes pérdidas económicas en los planteles avícolas (1). La detección, control y prevención de esta enfermedad es complicada debido a la capacidad infectiva, resistencia y alta variabilidad del virus. Las pruebas existentes para la detección y clasificación del virus han sido útiles para el estudio de la evolución de la enfermedad, no obstante, presentan dificultades con el manejo de los virus de campo en las granjas avícolas.

Por dichas razones, en este estudio se evaluó a la técnica de la RT-PCR con *primers* específicos-degenerados para incrementar la sensibilidad de la PCR como prueba de diagnóstico y la PCR como técnica de secuenciación para IBDV. Las muestras evaluadas fueron una vacuna y bursas infectadas con IBDV. Se evaluaron distintos aspectos en el diseño de la RT-PCR y en la elección del método de extracción. Se realizaron las PCRs de diagnóstico y secuenciación de IBDV para seleccionar el mejor par de *primers* específicos-degenerados los cuales fueron R6 con F11 para el segmento A y R7 con F12 para el segmento B. Se compararon dos tipos de enzimas transcriptasas inversas (M-MuLV y AMV), obteniendo mejores resultados con la enzima M-MuLV y agregando DMSO al 20%. Además se evaluaron las condiciones finales para la RT-PCR, mediante PCR de secuenciación parcial del segmento A y B, demostrando que el mix de los *primers*

específicos–degenerados junto con hexámeros aleatorios amplifica satisfactoriamente ARN proveniente de tejido de bursas. En conclusión, la RT-PCR diseñada con *primers* específicos-degenerados en conjunto con los hexámeros aleatorios incrementó la sensibilidad de la PCR de diagnóstico y secuenciación de IBDV.

Palabras Clave:

Bursa, RT-PCR, IBDV, secuenciación, ARN, DMSO, transcriptasas, M-MuLV, degenerados, hexámeros aleatorios.



ABSTRACT

The infectious bursal disease (or Gumboro disease) affects our country causing big economic losses in poultry farms (1). The detection, control and prevention of this disease is complicated due to the infective capacity, resistance and high variability of the virus. Current tests for the detection and classification of the virus have been useful for the study of the evolution of the disease, however, they present difficulties with the management of field viruses in poultry farms.

For these reasons, in this study the RT-PCR technique was evaluated with degenerate-specific primers to increase the sensitivity of the PCRs as a diagnostic and sequencing test for IBDV. The samples evaluated were a vaccine and stock infected with IBDV. Different aspects were evaluated in the design of the RT-PCR and the choice of the extraction method. IBDV diagnostic and sequencing PCRs were performed to select the best pair of degenerate-specific primers which were R6 with F11 for segment A and R7 with F12 for segment B. Two types of reverse transcriptase enzymes were compared, obtaining better results with the M-MuLV enzyme and adding 20% DMSO. In addition, the final conditions for RT-PCR were evaluated with partial sequencing PCR of segment A and B, demonstrating that the mix of specific-degenerated primers together with random hexamers successfully amplifies RNA from stock tissue. In conclusion, RT-PCR designed with degenerate-specific primers in conjunction with random hexamers increased the sensitivity of the diagnosis and sequencing PCR of IBDV.

Keywords:

Bursa, RT-PCR, IBDV, sequencing, RNA, DMSO, transcriptases, M-MuLV, degenerates, random hexamers.

INTRODUCCIÓN

El consumo del pollo se ha incrementado exponencialmente con el pasar de los años. El sector avícola se ha convertido en un negocio muy grande que conlleva muchos parámetros para la crianza adecuada de pollos aptos para el consumo humano.

La enfermedad infecciosa de la bursa perjudica significativamente la producción, teniendo que eliminar todos los animales infectados y los que estuvieron en contacto con estos. Debido a que es causado por un virus muy variable y resistente a muchos desinfectantes, su detección es difícil, afecta al sistema inmune del pollo y causa elevada mortalidad.

La identificación de estas cepas ayuda en la aplicación de un tratamiento diferencial, lo cual se puede lograr mediante tecnología de biología molecular que permite clasificar a los nuevos virus en el genogrupo apropiado. Adicionalmente, esta información puede ayudar a diferenciar virus vacunales de los circulantes y producir vacunas autógenas de acuerdo a las cepas locales (2).

El diagnóstico clínico en aves susceptibles se basa en la observación de los signos como edemas, hemorragias y plumas erizadas; en el caso subclínico solo se detecta por histopatología del tejido de la bursa o por aislamiento del virus en cultivo o en huevos embrionados (3). Sin embargo, estas pruebas demandan tiempo y no son de fácil disponibilidad, lo que conlleva a la búsqueda de un método, que permita un diagnóstico eficaz.

Aunque las actuales pruebas moleculares de diagnóstico son la alternativa más sensible también presentan algunas limitaciones: las PCR de diagnóstico y la de secuenciación son independientes y no detectan todas las variedades de IBDV. Hacer una PCR 1-paso (*one-step*) por cada tipo de PCR duplica el gasto, al ser PCRs independientes. Hacer ADNc para PCR en 2-pasos (*two-step*) no siempre es exitoso usando hexámeros aleatorios, ya que depende de la efectividad de la transcriptasa inversa, obteniendo resultados poco certeros, costosos y se necesitan pruebas adicionales para la comprobación de los resultados.

OBJETIVOS

Objetivo general

Desarrollar una RT-PCR utilizando *primers* específicos-degenerados para incrementar la sensibilidad de las PCRs de diagnóstico y secuenciación de Avibirnavirus.

Objetivos específicos

- Diseñar *primers* específicos - degenerados para todas las variantes de IBDV.
- Obtener ADNc del genoma del virus en todas las muestras analizadas.
- Optimizar la RT-PCR (dos pasos) para el diagnóstico de IBDV con los *primers* diseñados.
- Optimizar la RT-PCR (dos pasos) para la secuenciación de IBDV con los *primers* diseñados.
- Comparar la sensibilidad de la RT-PCR mejorada frente a la RT-PCR con hexámeros aleatorios.

HIPÓTESIS

En la industria avícola es necesario evitar y prevenir la propagación del virus de la enfermedad de Gumboro, por lo que se busca un diagnóstico rápido, certero y confiable. Dado que en el presente estudio se utiliza *primers* específicos–degenerados para IBDV, la RT-PCR diseñada será más sensible y específica que los PCR de rutina de diagnóstico y secuenciación.



CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. La enfermedad de la bursitis infecciosa

La Enfermedad Infecciosa de la Bolsa o Enfermedad de Gumboro afecta a pollos jóvenes a nivel mundial, apareciendo en todos los países con producción avícola importante y ha ido expandiéndose a través de los años debido a que es altamente contagiosa. Tiene un gran impacto económico debido a la mortalidad directa y a las infecciones secundarias que afectan la eficiencia productiva (1).

El desarrollo de la enfermedad depende de varios factores como la edad del ave, su estado inmunológico, la raza y la virulencia la variante del virus involucrado (4).

1.1.1. Etiología

La enfermedad de Gumboro es causada por el virus de la enfermedad infecciosa de la bursa. Este virus causa lesiones severas a la bursa o bolsa de Fabricio de los pollos jóvenes donde los linfocitos B son incapaces de alcanzar su madurez (4), este órgano es hematopoyético que solo está activo en los *primeros* 6 meses aproximadamente. Por tal motivo provoca inmunosupresión y se disemina rápidamente debido a que se transmite de forma horizontal. Cuando se encuentra un brote en alguno de los pollos es suficiente para que todo el galpón este contaminado causando grandes pérdidas en el sector aviar, pues tiene una alta tasa de morbilidad y mortalidad (3).

1.1.2. Patología y signos clínicos

Con la técnica de inmunofluorescencia (5) se demostró que el virus pasó de la infección oral hacia los macrófagos y células linfocitarias del yeyuno y ciegos en un periodo de 4 a 5 horas, que es el *primer* lugar donde se da la replicación viral. El virus entra a través del sistema venoso y llega hasta el hígado en 5 horas, donde las células de Kupffer fagocitan una importante carga viral. Luego el virus entra en el sistema circulatorio principal y logra infectar a varios órganos incluyendo la bursa. En la bursa, los linfocitos B inmaduros se

vuelven las células diana del virus y los análisis dan positivo a las 13 horas post infección. A las 16 horas ocurre otra replicación viral masiva en otros órganos linfáticos (6).

Los signos clínicos solo se manifiestan entre la segunda y octava semana, periodo con mayor concentración de linfocitos B inmaduros en la bursa. La multiplicación del virus descrita ocurre de forma similar para las variantes del IBDV menos virulentas, las variantes virulentas, se replican más rápido en cada etapa y ocasionan mayor severidad de los signos clínicos (6). La severidad de las lesiones también depende del tipo de ave (ponedoras o tipo carne) y del estado inmune del ave afectada. Se pueden distinguir dos cuadros clínicos:

- ***Infección aguda clínica***

Las características en pollos infectados de este cuadro clínico son: desarrollo súbito en la enfermedad, pollos deprimidos con plumas erizadas y picoteadas. La mortalidad y la morbilidad se manifiestan a los 3 días post infección (pico más alto), y luego de 5 a 7 días baja, lo más común es la mortalidad del 10-20%, sin embargo, en casos de cepas muy virulentas puede llegar a un 90% (7).

Las aves de postura tienen mayor índice de mortalidad que las aves de engorde. Al analizar aves muertas, se encuentra deshidratación y daño renal. También es común observar lesiones hemorrágicas en los músculos pectorales y muslos. La unión del proventrículo y la molleja suelen presentar hemorragias y erosiones. Las lesiones en la bursa varían dependiendo la evolución de la enfermedad. Algunos cambios que se suelen encontrar en la bursa son el tamaño, peso y morfología (6).

- ***Infección subclínica***

Este tipo de infección se presenta en aves que han sido infectadas durante las 2 primeras semanas de edad, con suficiente inmunidad maternal, evitando así el cuadro agudo clínico. Sin embargo, se produce la replicación del virus y consecuente atrofia de la bolsa, causando inmunosupresión e incrementando la susceptibilidad a infecciones secundarias (6).

Entre los efectos colaterales que comúnmente causa se encuentran la deficiencia alimentaria, la falta de uniformidad y el retraso en el crecimiento. Aunque no hay un alto riesgo de muerte como en la infección clínica, puede haber una mala respuesta inmune a vacunaciones futuras (7).

1.1.3. Propagación

El virus de campo es altamente contagioso, se propaga con facilidad en las aves susceptibles. Debido a su naturaleza el virus persiste en el ambiente del galpón, por tanto, las infecciones pueden potencialmente pasar de un lote de aves al próximo (8).

La enfermedad de Gumboro no se transmite verticalmente, la transmisión puede ser directa o indirecta mediante fómites. La transmisión horizontal por heces, equipo contaminado (especialmente calzados) o la materia orgánica es la ruta principal de diseminación; se ha demostrado que el *Alphitobius diaperinus* puede actuar como vector (9).

1.1.4. Reseña histórica de incidencias

La enfermedad infecciosa de la bursa era confundida en sus inicios con la bronquitis infecciosa debido a que ambas presentaban lesiones nefrotóxicas, luego se encontraron cambios patológicos específicos en la bursa (10).

En 1962 Winterfield logró el aislamiento del agente en huevos embrionados en el área de Gumboro, Delaware, EE.UU, de ahí el nombre de la enfermedad (9); luego Hitchner la llamó “enfermedad infecciosa de la bolsa” (10). El virus se extendió en Estados Unidos en 1965, sin embargo era controlado por vacunación ya que predominaban las cepas clásicas (11). En 1972 se encontró que el virus provocaba inmunosupresión en edad temprana (12).

En el año 1987 en Europa, aparecieron brotes de IBD muy virulentos causando hasta 60% de mortalidad en broilers y ponedoras, estas cepas se identificaron como IBDV muy virulentas o vvIBDV, del inglés *very virulent IBDV* (13), las cuales se propagaron rápidamente en 1990 por todo Asia (11,14). En 1995, la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) reportó varios países miembros con casos agudos de IBDV. En República Dominicana, Brasil y Venezuela se detectaron brotes causados por vvIBDV (15). Con relación a Perú, los *primeros* casos fueron reportados en 1969 por Ramos y Tsunechigen (5). Según un estudio en Latinoamérica, en el Perú se detectó la presencia de cepas variantes Delaware A y E, y clásicas como la PBG-98 y STC (16).

1.1.5. Control y prevención

El virus de Gumboro es muy persistente y sobrevive libre fácilmente en el ambiente. Aunque no tiene tratamiento para su erradicación completa, puede ser prevenida por

vacunas y buenos niveles de bioseguridad, desinfección y desinsectación, así como evitar los sistemas de multiedad para reducir la incidencia de la enfermedad (17).

El IBDV es un virus desnudo lo cual lo hace muy resistente a la mayoría de desinfectantes excepto a la cloramina, yodóforos y formalina (18). Es sensible a pH muy ácidos; sin embargo resiste a temperaturas altas de hasta 60°C (19). Todos estos aspectos hacen de su erradicación un trabajo muy difícil aún con una buena limpieza y desinfección (20).

Después de un brote es importante eliminar la camada y carcasas fuera de la granja. Luego se debe realizar una profunda limpieza y desinfección, donde se debe agrandar el periodo de reposo entre lotes de aves (mínimo 10 días) (21).

Para las reproductoras se utilizan vacunas inactivadas, con el fin de proporcionar anticuerpos maternos a la descendencia. Los pollitos se deben vacunar con vacunas vivas cuando los niveles de inmunidad maternal no neutralicen la vacuna (22).

Existen muchas vacunas comerciales para el control de la enfermedad de Gumboro, podemos encontrar las clásicas y otras más recientes.

- Vacunas vivas atenuadas de Gumboro: suaves, intermedias, intermedias plus y calientes.
- Vacunas de Gumboro inactivadas
- Vacunas de IBD de complejo inmune
- Vacunas IBD vectorizadas (22)

1.2. Virus de la enfermedad infecciosa de la bursa

Este virus pertenece a la familia Birnaviridae del género Avibirnavirus y está formado por ARN de doble cadena lineal segmentado. El genoma mide aproximadamente 6 kb, el segmento A mide 2.7 kb y el B mide 3 kb (16).

Es un virus muy estable y resistente a la mayoría de desinfectantes, logrando soportar pH extremos (pH 2 – 12), altas temperaturas (viable después de 30 minutos a 60°C), y alto nivel de sobrevivencia en el medio ambiente por largos periodos de tiempo (19).

1.2.1.1. Estructura viral

La cápside viral es de simetría icosaédrica, sin envoltura y de 70 nm de diámetro aproximadamente. Desde la cápside se proyectan radialmente 260 trímeros de la proteína VP2. La proteína VP3 junto con el ARN genómico forma un complejo de ribonucleoproteína (Figura 1). La proteína VP1 se encuentra unido al extremo 5' del ARN genómico (VPg) (23).

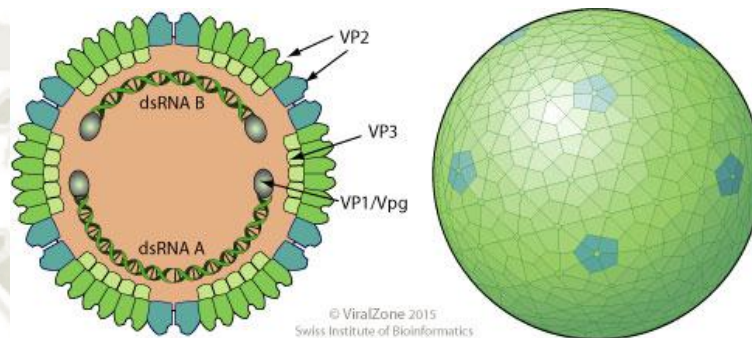


Figura 1. Estructura del virus de la enfermedad infecciosa de la bursa (23)

El Genoma está conformado por 2 segmentos A y B, que codifican 5 proteínas y algunos péptidos pequeños. El segmento A codifica la poliproteína estructural VP4 y también codifica un ORF alternativo (VP5). El segmento B codifica para VP1 (Figura 2)(24).

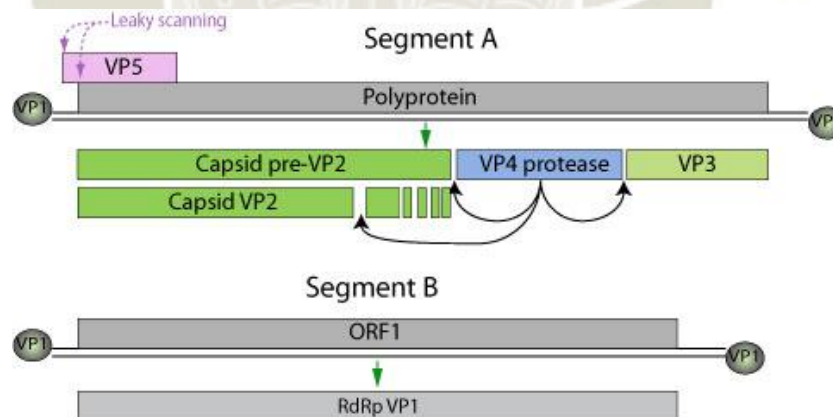


Figura 2. Marcos de lectura del segmento A y B (23)

Se han reconocido 5 proteínas designadas: VP1 juega un papel importante en la encapsidación de la partícula viral. VP2 codifica las principales determinantes antigénicas del virus, incluyendo los epítomos importantes en la neutralización del virus, VP3 es un antígeno específico del grupo, reconocido por anticuerpos no neutralizantes que actúa

como intermediario, interactuando con VP1 y VP2 y la formación de complejos VP1-VP3 parece jugar un papel importante en la morfogénesis de las partículas virales. VP4 es un polipéptido no estructural de menor importancia y VP5 aparentemente tiene función reguladora (24).

1.2.1.2. Evolución

Diversos virus suelen ser de difícil estudio y control debido a su alta tasa de mutación. Sin embargo, este Avibirnavirus ha evolucionado poco a poco desde su descubrimiento con la aparición del tipo antigénico variante, el cual infectó a pollos de engorde vacunados. Las vacunas comerciales eran de IBDV clásico y no protegían contra estas variantes antigénicas del virus (2).

En la actualidad se sabe que existen otros tipos antigénicos debido a la evolución del virus. Sin embargo algunas de las vacunas antiguas otorgan protección cruzada frente a nuevas cepas, mas no proporcionan protección completa ni son muy efectivas (2).

Investigadores del Consejo Superior de Investigaciones Científicas han descubierto que el IBDV presenta una cápside más grande de lo necesario para sobrevivir, sugiriendo que el virus aprovecha su tamaño para aumentar su capacidad infectiva y las dimensiones de su cápside le permitieron evolucionar hacia modelos virales más complejos (25).

1.2.1.3. Clasificación

En la caracterización del virus se identificaron dos serotipos 1 y 2; sólo el serotipo 1 es patógeno en pollos (26) y años después, se identificaron en dicho serotipo 6 subtipos antigénicos que incluyen cepas clásicas y variantes (27). Entre las cepas clásicas podemos encontrar las cepas estándar poco virulentas, así como casos severos causados por cepas muy virulentas, que se caracterizan con cuadros de infección clínica. Entre las cepas variantes se encuentran los brotes subclínicos de la enfermedad con continua recirculación dentro de las granjas, pocas veces diagnosticados, que comúnmente causan inmunosupresión sin ningún signo clínico característico (28).

También hay una clasificación por genogrupos obtenido mediante un análisis filogenético estandarizado de una región específica del genoma que puede aplicarse universalmente a las cepas de IBDV aisladas en todo el mundo. Los estudios realizados han demostrado que

las cepas de IBDV que forman parte del mismo genogrupo tienen muchas características antigénicas y patogénicas similares (29).

1.3. Métodos convencionales de detección de IBDV

La prueba de neutralización viral es el *gold standard* para el diagnóstico de la enfermedad; sin embargo, el método más usado es la prueba de ELISA de captura de antígeno por ser más económica y rápida que la neutralización viral; ambas se basan en la detección de antígeno-anticuerpo (30).

Para el aislamiento del virus en huevos embrionados o cultivos celulares, se maceran los tejidos infectados en medio con antibiótico, luego se centrifuga para remover tejido y se inocula el sobrenadante. La inmunofluorescencia directa y la inoculación en huevos embrionados, se usa para la detección directa del virus (18).

La precipitación en gel de agarosa es la detección de antígeno específico de IBDV es la prueba más accesible económicamente. La prueba que corrobora resultados de infección viral consta en la observación de lesiones y hemorragias en el análisis de la bursa y tejido muscular. IBD (14,20).

Las técnicas moleculares como RT-PCR, seguido de la restricción de polimorfismos de longitud de fragmentos (RFLP) han permitido la diferenciación y clasificación de patotipos del IBDV (2, 26).

Las PCR diseñadas para secuenciación ayudaron a la identificación de varios brotes nuevos en distintos países. En un estudio sobre el segmento A de IBDV, se compararon secuencias de diferentes cepas e identificaron una región variable en VP2, a partir de la cual se diseñaron *primers* que sirvieron para la identificación de las cepas (32).

1.4. Extracción de ARN

La calidad y pureza del ARN molde es esencial para el éxito de la RT-PCR, por eso es muy importante su adecuada extracción. El ARN posee una estructura química frágil y susceptible a la degradación por ARNasas, aspectos que se toman en cuenta principalmente en el proceso de extracción y purificación (33).

Actualmente existen varios métodos estandarizados para la extracción de ARN: como técnicas largas con solventes orgánicos y más modernas como kits comerciales que facilitan el proceso, reduciendo los riesgos de impurezas (34).

En este estudio, se evaluaron dos métodos de extracción, el *primero* basado en el uso de kits comerciales y el segundo con extracción fenólica.

1.4.1. Extracción basada en columna de afinidad

Los pasos característicos en un kit de extracción son la lisis celular, unión del ácido nucleico a la membrana, lavado y finalmente elución. La extracción de ARN con sistemas comerciales que capturan el ARN en columnas de afinidad, tiene como principal aseguramiento de materiales libres de ARNasa y ADNasa. Además, los protocolos están estandarizados y el uso de buffer que ayudan a mantener estable el ARN durante su extracción.

Se adiciona etanol a la solución de lisis y se pasa a través de la columna, eliminando la capa hidratante del ADN y exponiendo sus grupos fosfato, facilitando con ello la adsorción de la molécula a la membrana cargada positivamente. Los lípidos y proteínas no son afines a la membrana y se eliminan con ayuda de la solución de lavado y un ciclo de centrifugación, mientras que el material genético permanece unido a la matriz. Este sistema, además, facilita la separación del ARN de los demás componentes que pueden degradarlo mediante centrifugación (35).

En los kits es necesario liberar al ADN de la matriz. La membrana y el ADN se deshidratan con soluciones de lavado y ciclos de centrifugación, después se recomienda centrifugar nuevamente la columna para evaporar el etanol y eliminar el exceso de las soluciones. Posteriormente, se adiciona agua o solución amortiguadora al centro de la membrana, se espera a que el ADN se hidrate, se centrifuga para recuperarlo de la matriz y resuspenderlo (35).

- **Kit II de extracción de ácido nucleico viral Geneaid**

El kit II de extracción de ácido nucleico viral de Geneaid es específico para la extracción eficiente de ADN y ARN viral de muestras como suero, plasma, fluidos corporales y el sobrenadante de cultivos celulares infectados por virus (36). La columna de fibra de vidrio está optimizada para purificar desde 10^1 - 10^9 copias de ADN / ARN viral a partir de hasta 200 μ l de muestras proveniente de una amplia variedad de virus, con una duración

aproximada de 20 minutos. El ADN / ARN viral se puede usar directamente en ensayos qPCR y RT-qPCR (36).

1.4.2. Método de extracción con Genezol

El reactivo Genezol es una solución que contiene fenol, cloroformo e isotiocianato de guanidina a una concentración que permite extraer ARN total de alta calidad, ADN y proteínas a partir de muestras de sangre, plasma, suero, tejidos y cultivo de células (37). El ARN obtenido se puede usar directamente en RT-PCR, PCR en tiempo real, construcción de bibliotecas de ADNc, clonación, entre otras aplicaciones. Sin embargo este método es largo y requiere de varios reactivos adicionales, además necesita un manejo delicado y preciso. Algunas de las ventajas que podemos encontrar son: la extracción simultánea de ARN total, ADN y proteínas, un método rentable y escalable, hasta 300 uL de muestra y desde 50 hasta 100 mg de tejido (37).

1.5. La reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una reacción *in vitro*, donde la enzima ADN polimerasa copia fielmente una secuencia blanco de ADN después de repetir varios ciclos hasta lograr millones de amplicones (38).

La PCR debe tener los siguientes componentes: el molde (ADN o ADNc), la enzima, los oligonucleótidos o *primers*, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio (Mg⁺), una solución amortiguadora y H₂O. La reacción consta de 3 etapas: desnaturalización (el molde se separa), hibridación (se unen los *primers* al molde) y extensión (la enzima sintetiza la nueva cadena) (38).

Los equipos capaces de repetir estos pasos varias veces son los termocicladores. Estos equipos están diseñados para programar condiciones de temperatura y tiempo necesarios, manteniendo todos los ciclos iguales. Finalmente para confirmar si la reacción fue exitosa, los amplicones son analizados en geles de agarosa (39).

Dependiendo del origen del molde puede variar el tipo de reacción: para PCR convencional se usa ADN genómico y si se parte desde ADN complementario (ADNc) sintetizado a partir de ARNm se trata de una RT-PCR. El ADNc se utiliza cuando analizamos la expresión del ARNm de algún gen de interés (8).

El objetivo de la PCR es producir suficiente ADN de la región blanco para que pueda analizarse mediante otras técnicas como la visualización por electroforesis en gel, envío para secuenciación, digestión con enzimas de restricción y clonación en un plásmido (39).

- **PCR para detección:** En esta PCR se amplifica una región pequeña muy conservada en un organismo que sirve para detectar la presencia del agente en la muestra analizada. Los resultados se visualizan por electroforesis en gel. Es una prueba muy sensible y requiere el uso de controles positivos y blancos. Puede ser PCR punto final o tiempo real para cuantificación del amplicón (39).
- **PCR para secuenciación:** En esta reacción se busca amplificar una región que permita su posterior secuenciación e identificación del genotipo de un organismo. Los resultados se visualizan por electroforesis en gel y posteriormente se secuencian. Requiere de una buena concentración y alta pureza de ADN (39).

1.5.1. Transcripción inversa

También llamada transcripción reversa o retrotranscripción es una reacción ejecutada por la enzima transcriptasa reversa, que convierte el ARNm en ADNc. En la naturaleza, los retro virus usan la transcriptasa reversa para convertir su genoma de ARN en ADN y así replicarse en millones de partículas virales. La transcriptasa inversa o ADN polimerasa dependiente de ARN, es una enzima ADN-polimerasa, que en vez de realizar una transcripción directa (codificación de ARN a partir de ADN), lo ejecuta de forma inversa (codifica ADN a partir de ARN). Para la retrotranscripción del ARN con cola poli-A se usa un *primer de* cola de poli-T que se complementan e inician la síntesis de la nueva hebra formando un híbrido ARN/ADN. Luego este híbrido se puede separar con ribonucleasas y en una nueva reacción con la ADN-polimerasa más un nuevo primer se completa la doble cadena de ADN (40).

1.5.1.1. RT-PCR dos pasos

El ARN puede ser monocatenario o bicatenario y muy inestable, lo que dificulta su manejo en posteriores pruebas, por lo cual la RT-PCR es muy ventajosa al convertirlo en ADNc más fácil de manejar. La RT-PCR dos pasos consta de una retrotranscripción seguido de una PCR para detectar y amplificar ARN. El *primer* paso en la RT-PCR es la síntesis de un híbrido ADN / ARN, luego la cadena de ARN es degradada por la función RNasa H de la transcriptasa inversa. El ADN de cadena sencilla que queda, sirve como molde para la

síntesis de ADNc que realizará la función de ADN polimerasa dependiente de ADN que también posee la transcriptasa inversa. El segundo paso empieza con el producto del *primer* paso que se utiliza como molde para una PCR convencional que sintetizará muchas copias la secuencia deseada (41).

1.5.1.2. Tipos de enzimas de retrotranscripción

La transcriptasa inversa fue descubierta por Howard Temin en la Universidad de Wisconsin-Madison y por David Baltimore en 1970 en el Instituto de Tecnología de Massachusetts (MIT). Y desde su descubrimiento se ha continuado investigando su actividad e innovando en la recombinación para mejorar su eficacia *in vitro* (42).

Con el pasar de los años se han podido estudiar 4 tipos de enzimas de distintas fuentes.

- La transcriptasa inversa VIH-1 del virus tipo 1 de la inmunodeficiencia humana
- La transcriptasa inversa M- MuLV del virus de la leucemia murina Moloney
- La transcriptasa inversa AMV del virus de la mieloblastosis aviar
- La telomerasa transcriptasa inversa que mantiene a los telómeros de los cromosomas eucariotas (43)

1.5.1.3. Primers aleatorios

Los *primers* aleatorios son oligonucleótidos de secuencias desconocidas y aleatorias. Cada base se denomina N porque es aleatoria entre las 4 bases conocidas. Son de longitud corta, entre seis y ocho nucleótidos. Los más comunes son hexámeros aleatorios (dN 6). Estos *primers* son aleatorios no tienen un sitio de unión específico, uniéndose a ARN de diversa procedencia. Estos *primers* se usan comúnmente en la transcripción inversa de ARN sin colas de poli (A), ARN degradado y ARN con estructuras secundarias (como genomas virales) (44).

El aumento de la concentración de hexámeros aleatorios en las reacciones de transcripción inversa mejora el rendimiento del ADNc, sin embargo da como resultado fragmentos de ADNc más cortos debido al aumento de la unión en múltiples sitios en la misma plantilla. Si bien los *primers* aleatorios ayudan a mejorar la síntesis de ADNc para la detección, no son adecuados para la transcripción inversa de longitud completa del ARN largo. Una

mezcla de oligo (dT) y *primers* aleatorios se usa a menudo en RT-PCR de dos pasos para lograr los beneficios de cada tipo de *primer* (45).

1.5.2. RT-qPCR

La RT-qPCR o PCR de transcripción inversa cuantitativa es un método que primero transcribe ARN en ADNc mediante la enzima transcriptasa inversa, luego el ADNc sirve como plantilla para su amplificación y cuantificación en la qPCR. En la qPCR se detecta la fluorescencia emitida por el fluorocromo que ha sido excitado por un haz de luz de longitud de onda específica (40).

La RT-qPCR se puede realizar en uno o dos pasos.

-RT-qPCR de un paso: La transcripción inversa y la PCR se da en un solo tubo y un tampón, con *primers* específicos de secuencia.

-RT-qPCR de dos pasos: La transcripción inversa se realiza en un tubo y la PCR en otro, utilizando diferentes tampones, *primers* y condiciones de reacción.

La RT-qPCR tiene varias aplicaciones como el análisis de expresión génica, validación de microarrays, detección de patógenos, pruebas genéticas e investigación de enfermedades (46).

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo se desarrolló en las instalaciones del laboratorio de Epidemiología Molecular y Genética del Instituto de Medicina Tropical "Daniel A. Carrión" bajo la responsabilidad del Centro de Investigaciones Tecnológicas, Biomédicas y Medioambientales (CITBM) en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

2.1.1. Descripción del laboratorio

El laboratorio de Epidemiología Molecular y Genética cuenta con los equipos y estructura adecuada para desarrollar investigaciones de biología molecular y genética en el área de biotecnología. Este laboratorio consta con cuatro áreas perfectamente equipadas: el área de procesamiento de muestras cuenta con varias cabinas de flujo laminar para la extracción y procesamiento de ácidos nucleicos, ultracentrífugas refrigeradas y un espectrofotómetro para micro-volúmenes; el área de pre-pcr cuenta con dos cabinas de PCR con UV; el área de congeladoras cuenta con una ultracongeladora de -80 °C, varias refrigeradoras y una cabina UV para cargado de muestra; y el área de genómica cuenta con termocicladores (punto final y tiempo real) para detección y cuantificación de ácidos nucleicos, transiluminadores para revelar los geles de agarosa, un citómetro de flujo, entre otros.

2.2. Materiales

2.2.1. Muestras

- Cepa vacunal comercial de IBDV.
- Controles de ADN sintético de IBDV.
- ARN de muestras de bolsas diagnosticadas con IBDV.
- Controles negativos de ARN de aves libre de patógenos

2.2.2. Kits

- MIX AMV Reverse Transcription Kit - Neb BIOLABS

- MIX M-MuLV Reverse Transcription Kit - NEB BIOLABS
- KIT Taq Polymerase THERMO SCIENTIFIC
- Viral Nucleic Acid Extraction Kit II de Geneaid
- GScript First-Strand Synthesis Kit

2.2.3. Equipos

- Termociclador convencional ARTIK- THERMO SCIENTIFIC
- Termociclador en tiempo real BIORAD.
- Termobloque.
- Microcentrífuga
- Cabina de bioseguridad tipo II de flujo laminar.
- Cámaras de electroforesis.
- Fuente de poder.
- Documentador fotográfico.
- Transiluminador.
- Multispin
- Vortex.
- Microondas.
- Balanza analítica
- Autoclave
- Refrigeradora 4°C.
- Congeladora -20°C.
- Ultracongeladora -80°C.

2.2.4. Reactivos

- Agua destilada.
- Agua libre de nucleasas.
- Etanol absoluto.
- Hexámeros aleatorios – Neb Biolabs
- DMSO
- Redsafe.
- Agarosa.

- TAE 50X.
- Marcador de peso molecular de ADN de 100 bp y 50bp.
- Alcohol al 70%.
- Lejía al 10%.

2.2.5. Materiales de vidrio y otros

- Micropipetas.
- Matraces.
- Probetas.
- Puntas para micropipetas.
- Guantes de nitrilo.
- Tubos de polipropileno libre de nucleasas de 0.2 y 1.5 mL.
- Racks para microtubos de 0.2 y 1.5 mL.
- Tubos de centrífuga de 50 mL.
- Microplacas de 0.2 mL para PCR.
- Film adhesivo para placas de PCR.
- Parafilm

2.3. Métodos

2.3.1. Diseño de *primers* específicos-degenerados para IBDV

Para el diseño de *primers* específicos-degenerados se tomaron como referencia investigaciones sobre herramientas bioinformáticas para el diseño y análisis *in silico* de *primers* con degeneraciones (47–49).

2.3.1.1. Búsqueda de secuencias blanco en el Genbank

Se llevó a cabo la recopilación de secuencias de la base de datos de secuencias génicas, Genbank, del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Los parámetros que se utilizaron restringieron la búsqueda a especie de virus, solo secuencias ADN/ARN y CDS (del inglés *coding DNA sequence*) completo.

2.3.1.2. Selección de *primers* de IBDV

Se realizó un análisis de alineamiento múltiple con todas las secuencias y se identificaron las regiones conservadas a los extremos para la posterior selección de *primers*. El análisis se llevó a cabo con el programa Mega 7.

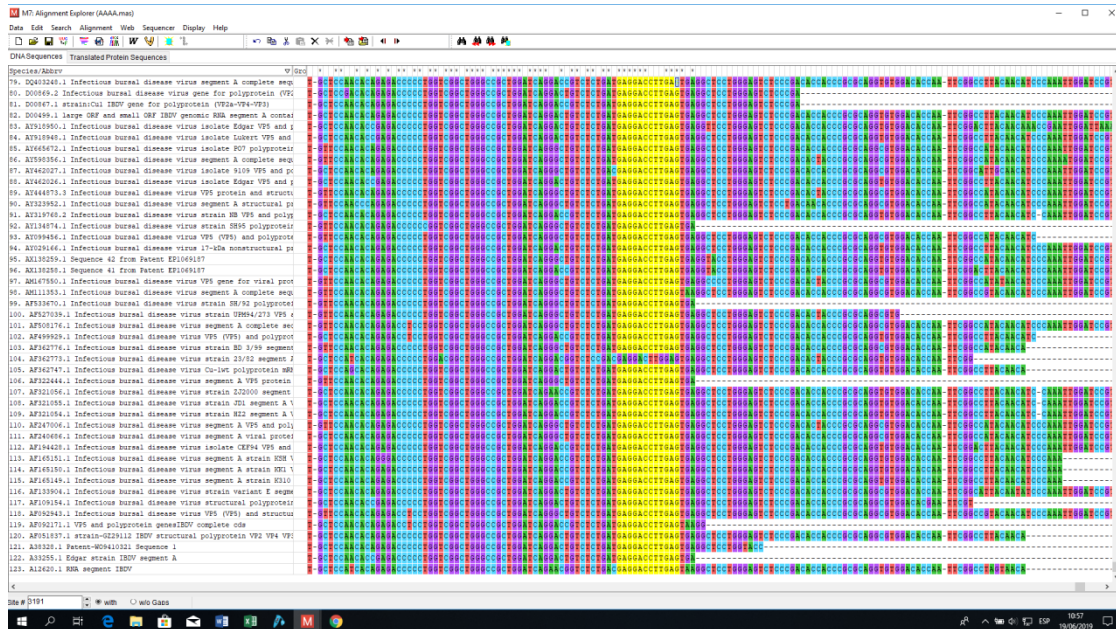


Figura 3. Alineamiento de secuencias blanco de IBDV en el programa Mega 7.0 (foto propia)

Como se puede observar en la figura 3 se seleccionaron secuencias conservadas en los extremos del alineamiento de secuencias con el fin de abarcar la mayor parte del genoma del virus. Luego se diseñaron varias parejas de *primers* en las zonas de mayor homología entre las secuencias obtenidas.

Se tomaron en cuenta los parámetros más importantes en el diseño de *primers*, como el contenido GC y la complementariedad de bases con el molde en el extremo 3' del *primer*.

2.3.1.3. Análisis *in silico* de parámetros de los *primers*

Después se procedió al análisis con el servidor Oligo Analyzer v3.1, para seleccionar a los que presenten mejores características tomando como referencia los valores de la temperatura de fusión de 55-65°C, contenido Guaninas y Citosinas de 50-60%, y la energía necesaria para formar estructuras secundarias ($dG \leq -9$ kcal/mol) (48,50).

En la tabla 1 y 2 se especificaron el molde inicial y el resultado final de los *primers* específicos – degenerados cortos y normales. Se analizó la especificidad de los *primers* con el servidor *Primer-Blast* y se eligieron los que sean específicos en género y especie.

El blast se hizo con todos los valores del rigor de especificidad de primers al máximo, es decir, con el mayor número de desajustes mínimos totales que se pueda encontrar con objetivos no deseados. Se mandó a sintetizar los *primers* en Bio Basic Inc. y se verificó su capacidad de amplificación y especificidad mediante varias RT-PCR.

Tabla 1.- *Primers específicos – degenerados de longitud corta*

<i>Primer</i>	5-3 molde	5-3 REVERSE COMPLEMENT	Segme nto	longit ud pb	Degenerado
R2	GAGGACCTTGAG	CTCAAGGTCCTC	A	12	CTCMARGTCCTC
R3	GAGGACCTTGA	TCAAGGTCCTC	A	11	TCMARGTCCTC
R4	GATGAGGACCTT	AAGGTCCTCATC	A	12	MARGTCCTCRTC
R5	ATGAGGACCTT	AAGGTCCTCAT	A	11	MARGTCCTCRT
R6	CTGATGAGGAC	GTCCTCATCAG	A	11	GTCCTCRTRG
R7	TTCGCCTGCGGG	CCCCGCAGGCGAA	B	13	CYCMGRAGGCGAA
R8	CCTTCGCCTGCGG	CCGCAGGCGAAGG	B	13	CMGCARGCGAARG
R9	GGCCTTCGCTG	CAGGCGAAGGCC	B	12	CARGCGAARGYC
	forward				
F11	TGACAAACCTG	-	A	11	TGACARACYTG
F12	GGCTACTAGGG	-	B	11	GGYTACTRGGG

Tabla 2.- *Primers específicos – degenerados de longitud normal*

<i>Primer</i>	5-3 molde	5-3 REVERSE COMPLEMENT	segm ento	longitud pb	Degenerado 5'-3'
B1F	GGCTCCTCTTCYT GATGA		B	18	GGCTCCTCTTCYTGATG A
B2F	CTCCTCTTCYTGA TGAYTCT		B	20	CTCCTCTTCYTGATGAYT CT
B3F	CCAYGTTAGHGG CTCCTCT		B	19	CCAYGTTAGHGGCTCCT CT
B1R	GGAACCAITCAA GAAGAGGAC	GTCCTCTTCTTGA RTGGTTCC	B	21	GTCCTCTTCTTGARTGGT TCC
B2R	AACCAITCAAGA AGAGGACA	TGTCCTCTTCTTG ARTGGTT	B	20	TGTCCTCTTCTTGARTGG TT
B3R	AAGAAGAGGACA CTAACC	GGTTAGTGTCTC TTCTT	B	18	GGTTAGTGTCTCTTCTT
A1R	TGGGSCGCTGGRT CAGRRC	GYYCTGAYCCAG CGSCCCA	A	19	GYYCTGAYCCAGCGSCC CA
A2R	TCTGACGAGGAC CTTGAGT	ACTCAAGGTCCTC GTCAGA	A	19	ACTCAAGGTCCTCGTCA GA
A3R	GTYTCYGACGAG GACBYKGAGT	ACTCMRVGTCCT CGTCRGARAC	A	22	ACTCMRVGTCCTCGTCA GARAC
A1F	TGACRAACYTGH HRGATCA		A	19	TGACRAACYTGHHRGAT CA
A2F	CCMRCAGATYGY TCCGTTYAT		A	21	CCMRCAGATYGYTCCGT TYAT

2.3.2. Obtención de ARN viral de IBDV

Para la obtención de ADNc es necesario la transcripción inversa, ya que el IBDV está conformado por ARN. Por tal motivo, la elección correcta del método de extracción de ARN es muy importante para el éxito del resto del procedimiento. En la mayoría de estudios moleculares sobre IBDV se suele trabajar con muestras de bursa pero en este trabajo se empezó con vacuna liofilizada resuspendida. Como se trabajaron con primers diseñados, era necesario una muestra conocida que sea positiva para IBDV como es el caso de la vacuna.

2.3.2.1. Descripción de la muestra

Se usó una vacuna viva de IBDV. Viene en forma de pellet liofilizado para reconstituir. Sus componentes activos por dosis son virus vivo de la Enfermedad de Gumboro, cepa D78 de 1000 dosis.

La vacuna se resuspendió en 10 mL de agua estéril en un tubo falcon de 50 mL. Se mezcló vigorosamente en vortex por varios minutos y luego se alicuotó 200 uL en tubos de polipropileno de 1.5 mL.

2.3.2.2. Extracción de ARN viral de IBDV

- Extracción con Kit II de Geneaid

Se usó el kit de extracción Viral Nucleic Acid Extraction Kit II de Geneaid para alícuotas de vacuna Gumboro resuspendida.

Se concentraron dos alícuotas de vacuna en un solo tubo de 200 uL. Una alícuota 200 uL se centrifugó a 300 x g por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se pasó el pellet a otra alícuota de 200 uL de vacuna resuspendida. Se añadió 400 uL de buffer VB más 5 uL de *carrier* de ARN, se vortexeó por 10 s y se dejó lisando por 10min a temperatura ambiente, agitando en vortex cada 3min.

Después de la lisis se agregó 450 uL de buffer AD, se vortexeó por 10 s y se realizó un spin corto, luego se transfirió 600 uL a una columna y se centrifugó a 16000 x g por 1 min, se descartó y se repitió el paso con el sobrante. Se cambió el tubo colector y se agregó 400 uL de buffer W1, se centrifugó a 16000 x g por 30 s, se descartó y se cambió el tubo colector. Se añadió 600 uL de *wash buffer* y se repite el paso anterior, luego se centrifuga nuevamente para secar la columna, se cambia a un tubo de polipropileno de 1.5 mL y se

añade 30 uL de agua libre de ARNasas, se dejó reposar a temperatura ambiente por unos minutos y se centrifugó para eluir a 16000 x g, se repitió el paso de elución para concentrar la muestra.

Se conservó en la ultracongeladora a -80°C hasta su uso.

- **Extracción de ARN con Genezol**

Dos alícuotas de vacunas de 200 uL cada una se centrifugaron a 300 x g por 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Se agregó 1 mL de Genezol a uno de los tubos y se re suspendió el pellet por pipeteo varias veces luego se mezcló con el otro pellet y se volvió a re suspender por pipeteo hasta disolver el pellet por completo y se dejó incubando por 5 minutos a temperatura ambiente.

Se añadió 200 uL de cloroformo y se vortexeó vigorosamente por 10 s, luego se centrifugó a 16000 x g por 15 minutos a 4°C para separar las fases. Se transfirió en un tubo nuevo la fase acuosa superior con mucho cuidado de no tocar las otras fases. Para precipitar el ARN se agregó un volumen de isopropanol y se mezcló invirtiendo el tubo varias veces, luego se dejó reposar por 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 16000 x g por 10 min a 4°C y se descartó el sobrenadante con cuidado de no perder el pellet. Luego se procedió a lavar con 1 mL de 70 % etanol, se vortexeó brevemente y se centrifugó a 16000 x g por 5 minutos a 4°C . Se eliminó el sobrenadante con una pipeta sin tocar el pellet. Se dejó secar el pellet por 10 min a temperatura ambiente, finalmente se resuspendió en 45 uL de agua libre de ARNasas y se dejó incubando a 55°C por 15min.

Se conservó en la ultracongeladora a -80°C hasta su uso.

2.3.2.3. Cuantificación del ARN por espectrofotometría

La cuantificación de ARN es necesaria para continuar con las técnicas de análisis. Si la muestra de ARN es pura, la cuantificación por el método de espectrofotometría ultravioleta (UV) permitirá la absorción precisa de las bases de purina y pirimidina (51).

Después de la extracción se cuantificó 1uL de ARN en el espectrofotómetro Thermo Scientific™ NanoDrop™ One (ANEXO 2) para tener valores de referencia de la concentración y la calidad según el método de extracción que se realizó. Estos valores solo son referenciales ya que el uso de *carrier* de ARN interfiere en la medición.

Para evaluar la calidad de ARN se debe analizar la relación de las absorbancias 260/280 y 260/230, tomando como referencia de pureza el valor de ~ 2 . La proporción 260/280 evalúa la cantidad de contaminación de proteínas residual del proceso de extracción. La proporción 260/230 posee sensibilidad para la contaminación de fenol, guanidina u otro compuesto orgánico residual del proceso de extracción (52).

2.3.3. Optimización de la RT-PCR para detección de IBDV

Dado que el objetivo del presente trabajo es el diseño de una RT-PCR mejorada para la detección y secuenciación de IBDV; es de suma importancia encontrar las condiciones óptimas de dicho proceso, por lo cual se evaluó las distintas variables que se encuentran en la RT-PCR de dos pasos.

2.3.3.1. Comparación de métodos extracción mediante RT-qPCR

Se realizó RT-qPCR para evaluar de forma directa la calidad y cantidad de ARN viral disponible en las vacunas extraídas mediante amplificación con curva estándar de 10^3 hasta 10^6 con el objetivo de tener las condiciones óptimas antes de empezar a probar los *primers* específicos – degenerados. Los estándares se obtuvieron a partir de diluciones seriadas de plásmidos sintéticos con concentración inicial de 10^{10} .

Se compararon dos métodos de extracción de ARN para trabajar con la mejor concentración de ARN viral con el fin de que dicha variable no afecte en los posteriores procesos experimentales. Como se menciona en el paso de obtención de ARN, se realizaron dos procedimientos totalmente diferentes debido al principio de acción de cada uno de sus componentes. Tanto el método de extracción con Genezol como el kit de extracción de Genaid presentan ventajas y desventajas y dado que el ARN es difícil de trabajar, es necesario encontrar el método adecuado que nos permita obtener ARN del genoma completo del virus.

Se utilizaron alícuotas nuevas de ARN y se descongeló a temperatura ambiente. En la RT-qPCR se preparó el master mix en la cabina de PCR previamente esterilizada con luz UV por 15 min. El mix contenía Qn Sybr Green RT Mix (1X), Quantinova Syber Green RT-Mix (1mM), 0.3mM de cada *primer* (tabla 3) y agua en un volumen final de 10 uL. En la cabina de cargado de muestra se cargaron (300 ng/uL) de ARN. Luego se programó el termociclador en tiempo real BIORAD T100 según la tabla 4. Esta prueba se realizó por triplicado.

Tabla 3.- Secuencias de primers de detección de IBDV(53)

Primers	Secuencia 5' a 3'	Tamaño del producto (pb)	Secuencia objetivo
F178	5'-GAGCCTTCTGATGCCAACAAC-3'	95	VP5/VP2 segment A
R272	5'-TCAAATTGTAGGTCGAGGTCTCTGA-3'		

Tabla 4.- Protocolo de amplificación de la RT-qPCR para detección de IBDV

CONDICIONES PCR			
PASOS	T °C	Tiempo	
Transcripción reversa	50	10 min	
Paso de activación inicial	94	2 min	40 ciclo
Desnaturalización	94	10 s	
Alineamiento/extensión	60	30 s	
	10	α	

2.3.3.2. Comparación de transcriptasas inversas y uso de DMSO

Debido a que la retrotranscripción depende en gran parte del tipo de enzima transcriptasa inversa que se use, *primero* se evaluó cuál enzima retrotranscriptasa es la adecuada y para los fines del presente estudio se necesita muy buena calidad e integridad de ARN. Se compararon los dos tipos de enzimas retrotranscriptasas: M-MuLV y AMV.

Otro punto muy importante a considerar es el uso o no de DMSO, en el paso de desnaturalización previo a la retrotranscripción, cuyo efecto varía según el tipo de enzima retrotranscriptasa. La desnaturalización y el DMSO sirven para tratar ARN con estructuras secundarias. Esta prueba se realizó por triplicado.

- **Desnaturalización de ARN:** Para la muestra que usó DMSO, se desnaturalizó el ARN. En un microtubo de 250 uL se agregó 1/5 de DMSO y 4/5 ARN según normas de la OIE (30) . Se incubó en el termociclador a 92°C por 3 min y luego se enfrió en hielo por 3 min.
- **RT-PCR:** Se pusieron a prueba todos los *primers* específicos-degenerados de longitud corta. Se siguieron los protocolos de MIX M-MuLV Reverse Transcription Kit y AMV Reverse Transcription Kit de NEB BIOLABS, en ambos protocolos se usaban las mismas concentraciones de reactivos. Se agregó el ARN desnaturalizado y sin tratamiento al mix previamente preparado. Se preparó el master mix en la cabina de

PCR previamente esterilizada con luz UV por 15 min. El mix contenía 0.5 U/uL de M-MuLV RT / AMV RT, buffer (1X), dNTP (0.5mM), 0.4 U/uL de inhibidor de ARNasas, 0.5uM de cada *primer* (tabla 1) y agua libre de ARNasas en un volumen final de 15 uL. En la cabina de cargado de muestra se cargaron 4 uL de ARN (300 ng/uL). Luego se programó el termociclador de punto final Thermo Scientific ARTIK a 42°C por 1h, después se conservó a -20°C.

- **PCR:** Se realizó PCR de detección con el ADNc obtenido. La PCR de detección con los *primers* F178 y R272 es la más común para la detección de IBDV que amplifica una región pequeña y específica del virus. Se siguió el protocolo estandarizado en el laboratorio. Se preparó el master mix en la cabina de PCR previamente esterilizada con luz UV por 15 min. El mix contenía 0.04 U/uL de taq polymerase Thermo, buffer (1X), dNTP (0.2 mM), MgCl₂ (1.5 mM), 0.3uM de cada *primer* (tabla 1) y agua libre de nucleasas en un volumen final de 15 uL. En la cabina de cargado de muestra se cargaron 2 uL de ADNc. Luego se programó el termociclador de punto final Thermo Scientific ARTIK según la tabla 5.

Tabla 5.- Protocolo de amplificación de la PCR de detección de IBDV

CONDICIONES RT- PCR			
PASOS	T °C	Tiempo	
Paso de activación inicial	95	5 min	
Desnaturalización	95	10 s	40 ciclos
Alineamiento	60	30 s	
Extensión	72	30 s	
Extensión final	72	1 min	
	10	α	

2.3.4. Optimización de la RT-PCR para secuenciación de IBDV

2.3.4.1. Comparación de la sensibilidad entre *primers* diseñados y hexámeros aleatorios

Los hexámeros aleatorios son los *primers* más comúnmente usados en la síntesis de ADNc a partir de ARN con estructuras secundarias, como es el caso del virus de la bursitis infecciosa. Se utilizó una versión recombinante de la enzima M-MuLV (GScript). Se

comparó el uso de *primers* específicos – degenerados, hexámeros aleatorios y el mix de ambos en la transcripción inversa. Esta prueba se realizó por triplicado.

- **Desnaturalización ARN:** En un microtubo de 250 uL se agregó 1/5 de DMSO y 4/5 ARN según normas de la OIE (30) . Se incubó en el termociclador a 92°C por 3 min y luego se enfrió en hielo por 3 min.
- **RT-PCR:** Se evaluaron los *primers* específicos-degenerados con mejores resultados en las pruebas anteriores. Se siguió el protocolo de GScript First-Strand Synthesis Kit. Se agregó el ARN desnaturalizado al mix previamente preparado. Se prepararon 3 mezclas en la cabina de PCR previamente esterilizada con luz UV por 15 min. Cada mix contenía 10 U/uL de M-MuLV RT, buffer (1X), dNTP (0.5mM), 2 U/uL de inhibidor de ARNasas, 0.005 M de DTT, 1 uM de cada *primer* (tabla 1) para el primer mix, 6 uM de hexámeros aleatorios para el segundo mix, 0.8 uM de cada *primer* mas 4 uM de hexámeros aleatorios para el tercer mix y agua libre de ARNasas en un volumen final de 15 uL. En la cabina de cargado de muestra se cargaron 4 uL de ARN (300 ng/uL). Luego se programó el termociclador de punto final Thermo Scientific ARTIK a 42°C por 1h, los productos fueron conservados a -20°C.
- **PCR de detección:** Se siguió el mismo protocolo mencionado anteriormente. En la cabina de cargado de muestra se cargaron 4 uL de ADNc. Luego se programó el termociclador de punto final Thermo Scientific ARTIK según la tabla 5.
- **PCR de secuenciación parcial del segmento A:** Se realizó la PCR de secuenciación parcial del segmento A para obtener el segmento A. Se siguió el protocolo estandarizado en el laboratorio. Se preparó el master mix en la cabina de PCR previamente esterilizada con luz UV por 15 min. El mix contenía 0.06 U/uL de taq polymerase Thermo, buffer (1X), dNTP (0.2 mM), MgCl₂ (2 mM), 0.4uM de cada *primer* (tabla 6) y agua libre de nucleasas en un volumen final de 15uL. En la cabina de cargado de muestra se cargaron 3 uL de ADNc. Luego se programó el termociclador de punto final Thermo Scientific ARTIK según la tabla 7.

Tabla 6.- Secuencias de primers de secuenciación de IBDV

Primers	Secuencia 5' a 3'	Tamaño del producto (pb)	Secuencia objetivo
VP2F-AL	GTAACAATCACACTGTTCTCAG	252	VP2 segment A
VP2R-AL	GATGGATGTGATTGGCTGGG		
B168-A	CATAAAGCCTACAGCTGGAC	721	VP1 segment B
B889-R	TCCAATTGATGACTTGAGG		

Tabla 7.- Protocolo de amplificación de la PCR de secuenciación parcial del segmento A y B

CONDICIONES RT- PCR					
	Secuenciación parcial del segmento A		Secuenciación parcial del segmento B		
PASOS	T °C	tiempo	T °C	tiempo	
Activación Inicial	95	5 min	95	5 min	
Desnaturalización	95	30 s	95	1 min	40 ciclos
Alineamiento	55	30 s	55	1min	
Extensión	72	30 s	72	1 min	
Extensión final	72	5 min	72	5 min	
	10	α	10	α	

2.3.4.2. Pruebas con bursas positivas para IBDV

Se evaluaron ARN de bursas positivas para IBDV pertenecientes al banco de muestras de BTS CONSUTORES SAC. Se realizó el mismo procedimiento de desnaturalización y retrotranscripción de GScript descrito anteriormente.

- **PCR de secuenciación parcial del segmento A:** Se siguió el mismo protocolo mencionado anteriormente. En la cabina de cargado de muestra se cargaron 3 uL de ADNc. Luego se programó el termociclador de punto final Thermo Scientific ARTIK según la tabla 7.
- **PCR de secuenciación parcial del segmento B:** Se realizó la PCR de secuenciación parcial del segmento B para obtener el segmento B. Se siguió el protocolo de i-StarTaq™ GH ADN Polymerase. Se preparó el master mix en la cabina de PCR previamente esterilizada con luz UV por 15 min. El mix contenía 0.1 U/uL de i-StarTaq™ GH ADN Polymerase, buffer (1X), dNTP (1 mM), 0.5mM de cada *primer*

(tabla 6) y agua libre de nucleasas en un volumen final de 15uL. En la cabina de cargado de muestra se cargaron 3 uL de ADNc. Luego se programó el termociclador de punto final Thermo Scientific ARTIK según la tabla 7.

2.3.5. Electroforesis

Se visualizaron los productos de amplificación mediante electroforesis de agarosa. Se preparó un gel de agarosa al 1.5% con volumen final de 80 mL para el caso de productos de secuenciación y de 2% con volumen final de 100 mL para productos de detección. Se pesó la agarosa según la concentración deseada, luego se añadió TAE 1X y Redsafe (0.05 uL / mL). Se calentó en el microondas hasta fundir totalmente la agarosa y finalmente se vertió en el molde. Cuando gelificó totalmente se sumergió en la cámara de electroforesis conteniendo TAE 1X y se procedió a cargar 5 uL de muestra y 1 uL de buffer de carga. Se corrió a 100 v por 1h y se visualizaron las bandas en un transiluminador de UV.



CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La detección molecular y secuenciación de IBDV han sido utilizadas mayormente en la investigación de la enfermedad, aunque sus ventajas deberían expandir sus aplicaciones. El diseño de nuevas técnicas moleculares para la detección e identificación de este virus es crucial para poder controlar y evitar nuevos brotes en nuestra región y país. En el trabajo realizado se encontraron resultados que promueven el uso de la técnica de RT-PCR dos pasos como método de detección de la enfermedad e identificación el genotipo de IBDV.

3.1. Diseño de *primers* específicos-degenerados para IBDV

Los *primers* se ubicaron en los extremos más conservados del segmento A y B para obtener el ADNc del genoma completo del virus, así como se muestra en la figura 4 y 5.

Se incluyó degeneraciones en aquellas bases puntuales donde la secuencia no presente un 100% de consenso en todas las bases de las zonas elegidas para el diseño de los *primers*.



Figura 4. *Primers* específico - degenerados anclados en el segmento A

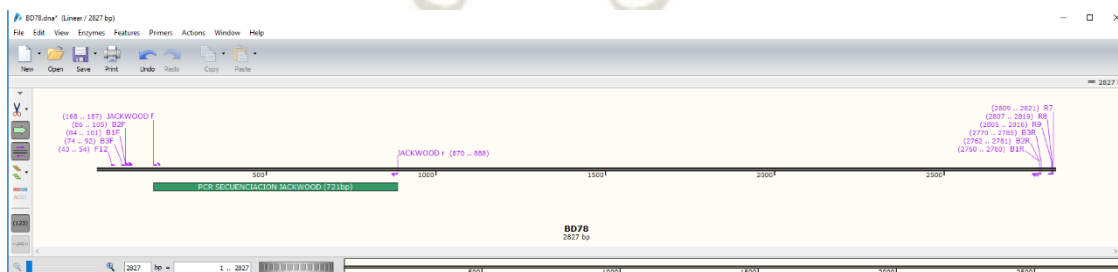


Figura 5. *Primers* específico - degenerados anclados en el segmento B

3.2. Análisis *in silico* de *primers* específicos – degenerados

Se diseñaron *primers* específicos – degenerados cortos y de tamaño normal que se usaron para sintetizar la *primera* cadena de ADNc a partir del ARN viral de IBDV.

En la tabla 8 y 9 se muestran los parámetros analizados, que son indicadores virtuales de qué tan eficientes pueden ser los *primers* en el proceso experimental.

Los *primers* cortos tienen una longitud de 11 a 13 nucleótidos y presentaron valores de T_m bajos, sin embargo este valor no afecta la reacción, ya que solo se usa la temperatura de incubación de la enzima y un periodo corto de incubación de 25°C para que se hibriden los *primers* o hexámeros aleatorios según sea el caso. Otro dato importante es que el contenido de GC de los *primers* están dentro del rango 50 - 60%, excepto los reverse pertenecientes al segmento B con valores mayores a 70%, aun así se consideraron para las pruebas experimentales puesto que provenían de zonas altamente conservadas.

Los *primers* ideales no deben poseer estructuras secundarias ni complementariedad entre sí, debido a que induce la formación de dímeros de *primers*, disminuyendo el rendimiento de la PCR (54). En el caso de los valores de formación de horquillas y dímeros, todos los *primers* se encuentran dentro del rango aceptable. En la última columna de las tablas 8 y 9 se observa los *primers* con degeneraciones incluidas, pero escasas degeneraciones en el extremo 3', pues este extremo que define una buena hibridación con el molde.

Tabla 8. Análisis de parámetros de *primers* específicos–degenerados de longitud corta

Nomb re	Segm ento	Longi tud nt	T_m °C	%GC	dG de horquillas kcal/mol	dG de dímeros kcal/mol	<i>Primers</i> degenerados 5'-3'
R2	A	12	38	58.3	1.72	-20.9	CTCMARGTCCTC
R3	A	11	34.3	54.5	1.72	-19.3	TCMARGTCCTC
R4	A	12	36.2	50	0.87	-20.77	MARGTCCTCRTC
R5	A	11	32.1	45.5	0.87	-19.2	MARGTCCTCRT
R6	A	11	32.4	54.5	1.44	-17.72	GTCCTCRTCRG
R7	B	13	55.8	76.9	-1.34	-32.85	CYCMGRAGGCGAA
R8	B	13	53.6	76.9	-1.34	-31.38	CMGCARGCGAARG
R9	B	12	49.1	75	-2.1	-27.77	CARGCGAARGYC
F11	A	11	31.7	45.5	0.97	-17.76	TGACARACYTG
F12	B	11	36.2	63.6	2.3	-20.91	GGYACTRGGG

Los *primers* de longitud entre 18 a 21 nucleótidos, presentaron valores de Tm dentro del rango aceptable (55 – 65°C) los cuales se diseñaron con el fin de aumentar especificidad y que también puedan servir para la amplificación del genoma completo en el futuro. Con respecto al contenido de GC, como se puede observar, los *primers* B1F, B3F, B1R, A2R, A3R y A2F están dentro de los valores aceptables (50 - 60%). Los valores de formación de horquillas y dímeros se encuentran dentro del rango aceptable (≥ -9 kcal/mol) (50). Al igual que en la anterior tabla, en la última columna se observa los *primers* con las degeneraciones incluidas, con 5 degeneraciones como máximo.

Tabla 9. Análisis de parámetros de *primers* específicos – degenerados de longitud entre 18 a 21 pares

Nom bre	Segm ento	Longit ud nt	Tm °C	% GC	dG de horquillas kcal/mol	dG de dímeros kcal/mol	<i>Primers</i> degenerados 5'-3'
B1F	B	18	59.9	52.8	0.58	-3.14	GGCTCCTCTTCYTGATGA
B2F	B	20	59	45	0.58	-1.57	CTCCTCTTCYTGATGAYTCT
B3F	B	19	63.4	57	1.14	-9.07	CCAYGTTAGHGGCTCCTCT
B1R	B	21	61.9	50	-0.52	-3.52	GTCCTCTTCTTGARTGGTTCC
B2R	B	20	60.8	42.5	-0.52	-3.52	TGTCCTCTTCTTGARTGGTT
B3R	B	18	56.3	44.4	0.49	-3.07	GGTTAGTGTCCCTCTTCTT
A1R	A	19	67.9	70.6	0.28	-9.86	GYCTGAYCCAGCGSCCCA
A2R	A	19	62.7	52.6	0.31	-4.67	ACTCAAGGTCCTCGTCAGA
A3R	A	22	67.1	57.6	0.41	-10.07	ACTCMRVGTCCTCGTCRGARAC
A1F	A	19	60	43	0.72	-14.18	TGACRAACYTGHHRGATCA
A2F	A	21	64.3	50	1.02	-6.79	CCMRCAGATYGYTCCGTTYAT

El diseño de los *primers* usualmente depende de la localización de la región que se desea amplificar, lo cual limita su uso, como es el caso de la amplificación parcial del gen VP2 del segmento A (55) y VP1 del segmento B (56). Los *primers* en este trabajo se diseñaron manualmente y sin ayuda de ningún software con el propósito de situar los *primers* en los extremos y a partir de todas las especies encontradas. El diseño de los *primers* se basó en la *primera* síntesis de ADNc de todo el genoma y así pueda servir para las distintas PCR posteriores de detección y secuenciación, así como también la secuenciación de todo el genoma para la identificación y estudio de nuevas cepas de IBVDV.

3.3. Cuantificación de ARN por espectrofotometría

En la comparación de métodos de extracción se obtuvieron ARN con pureza y concentración distinta debido a la naturaleza de los componentes utilizados en cada

método de extracción. Se determinó la concentración y pureza de ARN obtenido en cada método de extracción, mediante espectrofotometría, usando el equipo NanoDrop One. En la tabla 10 se observan los valores de las mediciones que se realizaron después de cada extracción.

Como se muestra en la tabla 10, la extracción con genezol presentó mayor concentración en un inicio, sin embargo en los demás intentos presenta contaminación con fenol y menor concentración. La calidad de ARN fue buena para la extracción con Kit en relación a las absorbancias A260/A280 y A260/A230, tomando como valor de pureza ~ 2 (52), y para la extracción con genezol se obtuvo bajos valores en A206/A230, indicando mala calidad de ARN. La presencia de fenol en ácidos nucleicos puede afectar la PCR (57,58). Se realizaron extracciones con y sin *carrier* para observar cómo afecta a la concentración de ácidos nucleicos, a pesar que se obtuvo menor concentración de ácidos nucleicos en el método sin *carrier*, la concentración no disminuyó significativamente con respecto al uso de *carrier*. Estos datos son representativos de la prueba realizada por triplicado (ANEXO 3).

Tabla 10. Cuantificación de ARN por NanoDrop One

Nombre de muestra	ARN (ng/uL)	A260/A280	A260/A230	Impureza 1	Impureza 1 A260	Impureza 1 %CV
KIT con <i>carrier</i>	427,933	2,132	2,153			
KIT sin <i>carrier</i>	308,382	2,123	2,131			
Genezol	546,107	2,004	1,396			
Genezol	384,940	1,915	0,5380	Fenol	1,2497	5,3133
Genezol	255,550	1,962	1,958	Fenol	0,6917	8,9500

Otro reactivo similar al Genezol es el Trizol (Invitrogen), usado como método de extracción en una investigación sobre secuenciación del genoma completo de una cepa uruguaya de linaje distintivo (dIBDV), el ARN viral se aisló del tejido de las bursas lo cual supone un paso inicial diferente y el requerimiento de un reactivo mucho más fuerte por el tipo de muestra (4). El uso de este tipo de reactivos como Genezol y Trizol se debe usar con mucho cuidado y dependiendo del tipo de muestra pues existe un riesgo de contaminación de fenol o guanidin isotiocianato como en el presente trabajo.

3.4. RT-qPCR para la comparación de métodos de extracción de ARN

Se realizó RT-qPCR de detección para evaluar la cantidad de ARN de IBDV mediante detección de amplicones según la curva estándar (Figura 6).

Se generó una curva estándar con diluciones seriadas del plásmido sintético desde 10^4 hasta 10^6 con un R^2 de 1 y una eficiencia de amplificación de 93,9%.

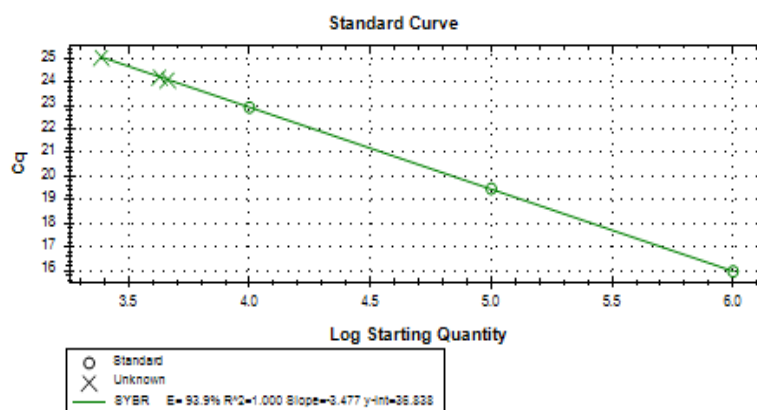


Figura 6. Curva estándar (10^4 - 10^6) de la RT-qPCR de detección de IBDV. Se muestran valores del coeficiente de correlación (R^2), el intercepto (B) y la eficiencia (E)

En la figura 7 se observa la curva de amplificación, de color azul el ARN extraído con kit y de color fucsia ARN obtenido con genezol. Esta gráfica es representativa de la prueba realizada por triplicado.

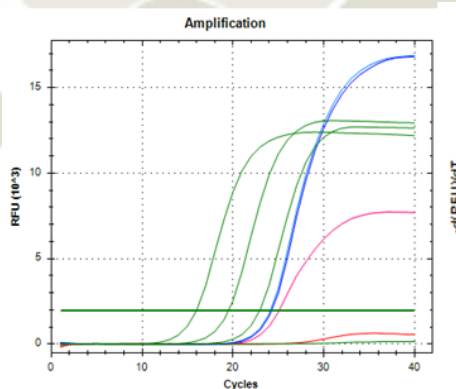


Figura 7. Curva de amplificación de la RT-qPCR de detección de IBDV

De color verde se muestra la curva estándar con los controles sintéticos de 10^4 hasta 10^6 . En la curva de amplificación se observa que el ARN obtenido con kit tiene mayor amplificación que genezol, e igual cq que el estándar 10^4 , lo cual indica que presenta similar cantidad de ARN viral.

Con los valores finales de la tabla 11 de la qPCR se observó que la cantidad de ARN extraído con ambos métodos es similar.

Tabla 11.- Datos de análisis de qPCR de detección comparando métodos de extracción

Muestra	Cq	SQ	RFU
STD 6	15.96	1.00E+06	12242.92
STD 5	19.47	1.00E+05	12965.39
STD 4	22.92	1.00E+04	12657.52
ARN GENEZOL	25.06	2.44E+03	7706.14
ARN KIT S/Carrier	24.10	4.59E+03	16749.07
ARN KIT C/Carrier	24.22	4.25E+03	16676.58
Agua			595.52

El ARN es muy lábil e inestable o cual lo hace muy difícil de trabajar y existen muchas condiciones en la extracción que pueden influencian directamente en los posteriores procesos del *downstream* (58). Como el método de extracción por genezol tiene muchas desventajas como la contaminación por fenol, la dificultad en la manipulación y el tiempo extenso de extracción, se decidió continuar la extracción de ARN con el kit de Geneaid.

3.5. Comparación de enzimas de transcripción inversa y uso de DMSO

Se evaluaron todos los *primers* específico – degenerados cortos. Cada PCR se realizó por triplicado para corroborar resultados. Según los resultados que se muestran en la figura 8 se observó que se obtienen mejores productos del ARN desnaturalizado con DMSO al 20%. En la imagen los carriles con A pertenecen a las muestras amplificadas con la enzima AMV y los carriles con Mu se amplificaron con M-MuLV.

Las mejores bandas son los productos con *primers* R3, R6y R7 con DMSO. En los productos sin DMSO se nota la presencia de dímeros y resultados irregulares e inconstantes. No se obtuvo amplificación con los *primers* R2, R8 y R9 sin DMSO no salieron positivos, solo dímeros. La PCR con *primer* R2 y DMSO produjo bandas tenues y se observó la presencia de dímeros. Los amplicones de los *primers* R8 y R9 con DMSO resultaron positivos pero con dímeros, a pesar que estos fueron diseñados para el segmento B, al ser cortos y degenerados se hibridan a algunas partes del segmento A, logrando dar resultados positivos en la PCR de detección.

Con respecto a la enzima transcriptasa inversa, se obtuvieron resultados más constantes con la enzima M-MuLV en conjunto con el uso de DMSO, esta enzima se usa para ARN largos (> 5 kb) debido a la menor actividad de ARNasa H en comparación con AMV. La AMV es recomendable para la transcripción inversa de ARN <5 kb y con altas temperaturas de reacción se puede resolver estructuras secundarias fuertes, aunque estas temperaturas perjudican la integridad del ARN (59). Estos aspectos son acordes a los resultados obtenidos, ya que se usó la misma temperatura media de incubación (42 °C) para la retrotranscripción; sin embargo, al usar ARN desnaturalizado la M-MuLV dio mejores resultados. Esta figura es representativa de la prueba realizada por triplicado (ANEXO 4).

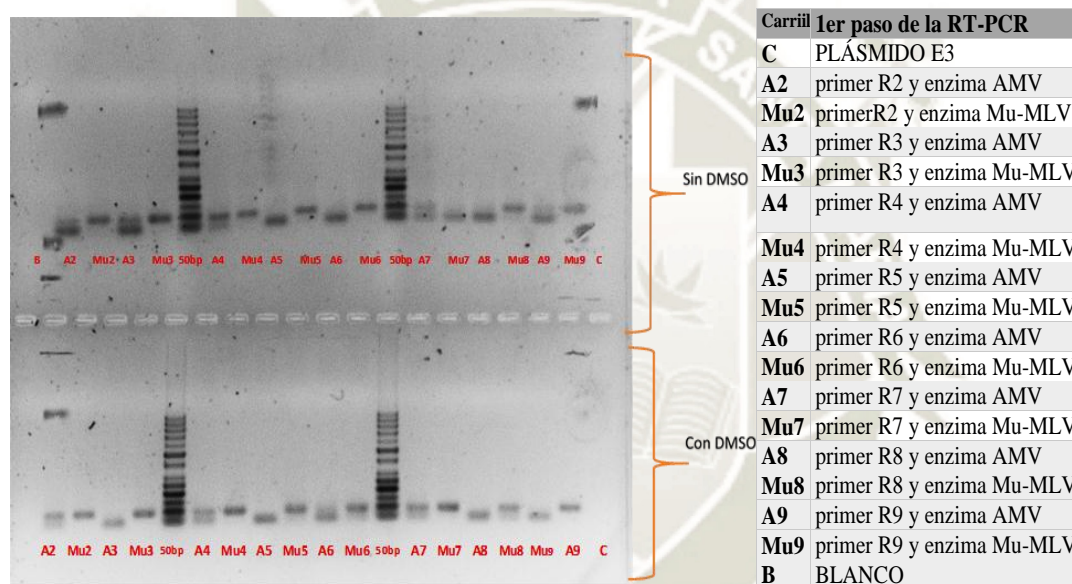


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de RT-PCR de detección de IBDV comparando enzimas retro-transcriptasas (AMV y M-MuLV) y uso de DMSO en la desnaturalización de ARN

El uso de DMSO ayuda a trabajar ácidos nucleicos con estructuras secundarias y funciona eficazmente junto con la enzima M-MuLV pues complementa su acción de tratar las estructuras complejas del ARN sin degradar el híbrido ADN-ARN, permitiendo ADNc largos, aunque también se recurre a la incubación a 65 ° C durante 5 min como método de desnaturalización cuando el ARN es rico en GC.

3.6. Comparación entre *primers* específicos-degenerados y hexámeros aleatorios.

Con los *primers* específicos–degenerados que obtuvieron mejores resultados en la anterior evaluación, se evaluó la mejor mezcla de *primers* en una RT-PCR frente a hexámeros aleatorios y el mix de ambos. En la figura 9 se puede observar que las mejores bandas

(banda superior de 95 pb) son las del carril 3,5,7,8,10 y 11; aunque la diferencia de intensidad no es muy notoria se corroboran resultados con la posterior PCR de secuenciación parcial del segmento A. Esta figura es representativa de la prueba realizada por triplicado (ANEXO 4).

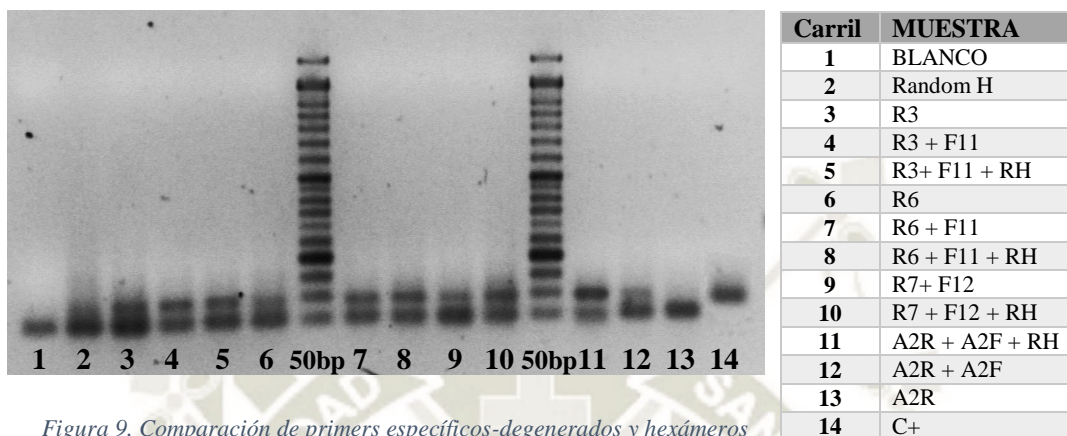


Figura 9. Comparación de primers específicos-degenerados y hexámeros aleatorios mediante RT-PCR detección de IBDV

De todas las bandas más intensas encontradas, la mayoría eran pertenecientes al mix de *primers* específicos-degenerados (sentido + antisentido) más los hexámeros aleatorios. Para tener resultados más certeros se tomó en cuenta la PCR de secuenciación parcial del segmento A, debido a que es un amplicón más grande que la PCR de detección. En la figura 10 se observa una mayor diferencia en la intensidad de bandas a pesar de ser los mismos ADNc que la PCR de detección. Los *primers* que se usaron fueron R3, R6 y R7 y A2R como *primers* antisentidos y F11, A2F como *primers* sentido. Se logró mejores resultados con el mix de hexámeros aleatorios con los *primers* específicos – degenerados. Se observan bandas más intensas en los carriles 6, 8,10 y 11, pertenecientes al mix de los *primer* A2R, R3 y R6. El mix de *primers* R6 del carril 10 mostró la banda más fuerte. Esta figura es representativa de la prueba realizada por triplicado.

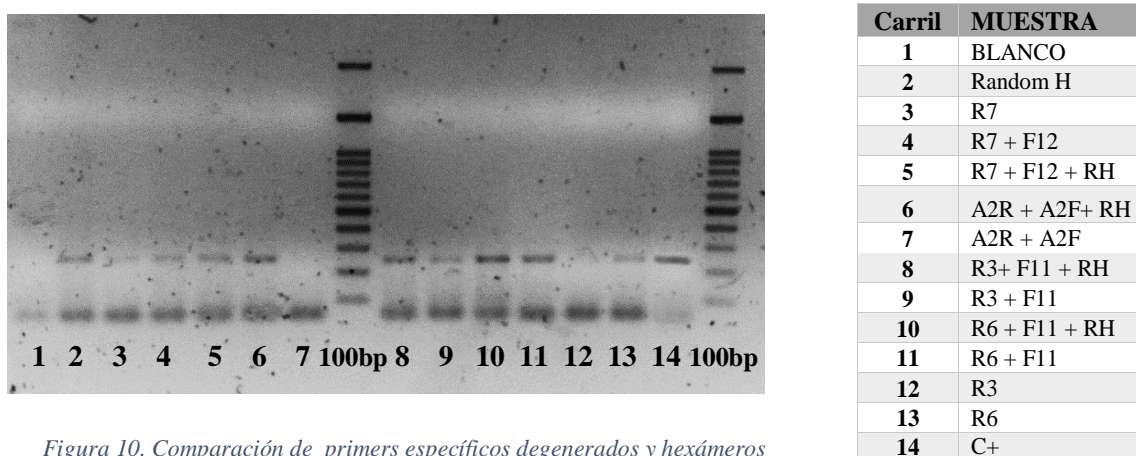


Figura 10. Comparación de primers específicos degenerados y hexámeros aleatorios mediante RT-PCR de secuenciación parcial del segmento A de IBDV

La síntesis de ADNc con hexámeros aleatorios se suele utilizar para la secuenciación e identificación de nuevas cepas de IBDV, como el trabajo “Secuencia del genoma de IBDV de una cepa uruguaya de linaje distintivo (dIBDV)”, en el cual se utiliza los hexámeros aleatorios para la síntesis del ADNc y luego se procede con la detección de la cepa mediante qPCR (4).

3.7. RT-PCR para la secuenciación parcial del segmento A con muestras de bursas positivas para IBDV

En esta prueba se usaron todos los parámetros seleccionados en las anteriores pruebas y se usó el mix de *primers* específico- degenerados junto con hexámeros aleatorios (R6 + F11 + R.H). Mediante la PCR parcial del segmento A se evaluaron muestras de ARN de bursas confirmadas con IBDV y de las 10 analizadas, 8 resultaron positivas (252 pares de bases). Esto demuestra que los *primers* específicos-degenerados junto con hexámeros aleatorios amplifican satisfactoriamente y fielmente ARN guardado proveniente de muestras de tejido de bursas. El éxito de la RT-PCR diseñada con el mix de los *primers* diseñados y hexámeros aleatorios, depende de repetir los buenos resultados con muestras de campo, como se observó en la figura 11 Esta figura es representativa de la prueba realizada por triplicado.

Carril	MUESTRA
-1	BLANCO
2	IBD CHIMU 10-1
-3	SF07 27d-2
4	SF07 21d-2
-5	IBD CHIMU 9-1
6	SF02 21d-1 (18)
7	SF05 28d-1
8	IBD CHIMU 4-1
9	SF10 28d-1
10	SF04 28d-2

11	IBD CHIMU 11 (11)
12	C+ E5

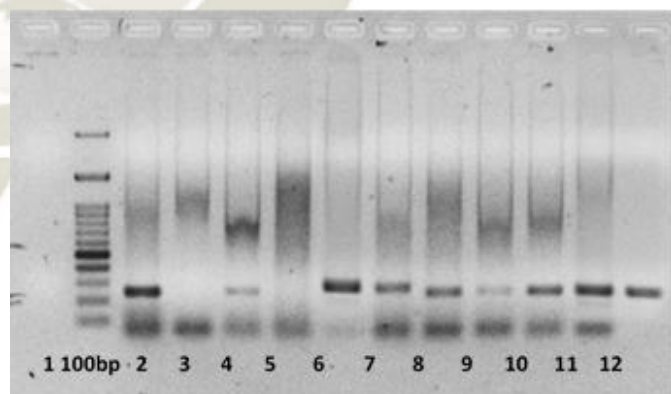


Figura 11. RT-PCR dos pasos y PCR secuenciación parcial del segmento A de muestras positivas de IBDV.

El resultado satisfactorio de la RT-PCR diseñada con el mix de *primers* degenerados y hexámeros aleatorios, depende de la estandarización previa seguida de la validación con muestras de campo. La evolución de IBDV a lo largo del tiempo ha desencadenado numerosos tipos antigénicos y patogénicos del virus. La PCR para secuenciación parcial

del segmento A es sin duda la que más información brindará para poder caracterizar las cepas de IBDV. Existen muchos trabajos basados en esta PCR, por ejemplo, en el 2004, el estado de Minas Gerais realizó la secuenciación y el análisis filogenético basado en el gen que codifica la proteína VP2 para caracterizar el agente de dos brotes de la enfermedad de Gumboro en bandadas. Los resultados indicaron que los brotes podrían ser relacionados con el virus vacunal (61), lo cual confirma la importancia del estudio sobre este virus. La fomentación de la divulgación sobre los brotes de esta enfermedad en nuestro país, debe ser incentivada por el control de calidad de este sector, y de esta forma compartir métodos de control y prevención, como el uso de vacunas, para la cepa específica del virus. La selección de estrategias, productos y programas de vacunación más eficaces son fundamentales para prevenir la enfermedad (60).

3.8. RT-PCR para la secuenciación Parcial del segmento B con muestras de bursas positivas para IBDV

La PCR de secuenciación parcial del segmento B es más difícil de amplificar que la PCR detección y secuenciación parcial del segmento A. Debido a que el amplicón es mucho más grande, se tuvo que recurrir a una enzima mucho más eficiente como la i-StarTaq™ GH ADN Polymerase. En los resultados de la figura 12, se observa el control en el octavo carril con un tamaño de 721 pares de bases que indica si los amplicones obtenidos fueron los esperados. De las 9 muestras analizadas, 5 resultaron positivas con buena intensidad de bandas. Esto corrobora los resultados obtenidos en la PCR parcial del segmento A en algunos casos. También se intentó la amplificación de todo el segmento A y del segmento B de IBDV pero aún se deben ajustar condiciones en la PCR.

CARRIL	MUESTRA
1	BLANCO
2	SF02 21
3	IBD CHIMU 4-1
4	SF10 28d-1
5	SF04 28d-2
6	SF07 21d-2
7	SF05 28d-1
8	C+
9	CHIMU 10
10	CHIMU 11
11	SF02 21d-1 (18)

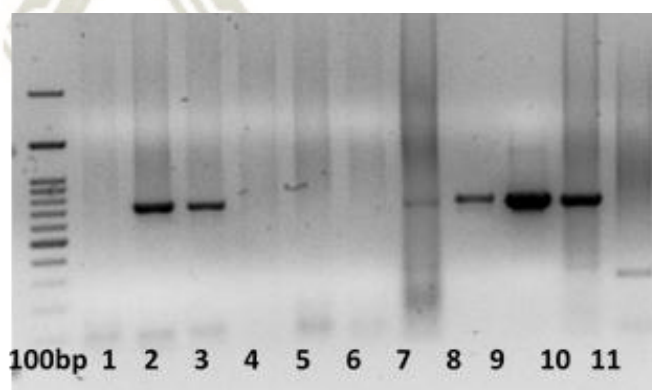


Figura 12. RT-PCR dos pasos y PCR secuenciación parcial del segmento B de muestras positivas de IBDV.

El segmento B de IBDV no tiene tantas referencias como el segmento A, sin embargo, este segmento está constituido por el gen VP1, conocido por su contribución en la epidemiología del IBDV, ya que muestra múltiples linajes filogenéticos. En el estudio “Seguimiento de la epidemiología molecular del virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa (IBDV) aislado en Brasil” se logró la caracterización genética, análisis filogenéticos y poblacionales de muestras de diferentes regiones del mundo mediante 68 secuencias codificantes VP1 (2634 nt) y 102 VP2 (1356 nt) (29). Los resultados positivos obtenidos en esta tesis con la PCR para secuenciación parcial del segmento B también son de suma importancia para distinción de cepas y estudio de IBDV. Estos resultados también contribuirán para que los productores de granjas de aves tengan acceso a una prueba de diagnóstico con un resultado más certero y en menor tiempo. Su alta sensibilidad permitirá el análisis de muestras con baja carga viral presentes en muestras de campo sin necesidad de su replicación en cultivo o en huevos embrionados y brindará la oportunidad de analizar varias muestras de forma rápida y simultánea. Se espera que todas estas ventajas promuevan la prevención, eviten la propagación de IBDV y disminuyan las pérdidas producidas por esta enfermedad en aves.

CONCLUSIONES

1. Los *primers* específicos–degenerados fueron diseñados con todas las variantes de IBDV. Se diseñaron 10 *primers* de longitud corta (11 – 13 nucleótidos), 6 para el segmento A y 4 para el segmento B, con un máximo de 3 degeneraciones por primer. Se diseñaron 11 *primers* de longitud normal (18 – 22 nucleótidos), 5 para el segmento A y 6 para el segmento B. Los *primers* diseñados presentaron valores de GC, Tm y dG para formación de dímeros aceptables para la prueba experimental.
2. Se obtuvo el ADNc del genoma del virus de la vacuna y las burras positivas para IBDV, mediante la transcripción inversa con los *primers* específicos–degenerados que se unen en los extremos de los 2 segmentos del ARN extraído del virus. Para la obtención del ARN completo de los segmentos A y B de la vacuna, se evaluaron 2 métodos de extracción: con kit II de Geneaid y extracción con genezol. Se obtuvo mejores resultados con el kit II de Geneaid y se logró obtener un ARN de buena calidad.
3. Se optimizó la RT-PCR de detección de dos pasos con los *primers* específicos–degenerados para la transcripción inversa y los primers F178 y R272 para la PCR de diagnóstico. Los mejores resultados se obtuvieron con los mix de *primers* específicos–degenerados R3, R6 y A2R más los hexámeros aleatorios.
4. La optimización de la RT-PCR de secuenciación de dos pasos se logró con el mix de *primers* específicos–degenerados R6 con F11 y R7 con F12 más hexámeros aleatorios para la transcripción inversa y con los *primers* VP2F-AL/VP2R-AL y B168-A/B889-R para la PCR de secuenciación parcial del segmento A y B.
5. Se incrementó la sensibilidad de las PCRs de diagnóstico y secuenciación con la RT-PCR optimizada con el mix de *primers* específicos–degenerados de corta longitud R6 con F11 y R7 con F12 (0.8 uM de cada *primer*) más hexámeros aleatorios (4 uM). La RT-PCR permitió la amplificación de segmentos que luego pueden ser secuenciados, identificados y caracterizados a nivel molecular. Esta RT-PCR también confirma la presencia de ADNc apto para la amplificación parcial o total del segmento A y B.

RECOMENDACIONES

1. Es necesario trabajar con extremo cuidado a nivel molecular y previa revisión bibliográfica, debido a que la detección del virus de la enfermedad infecciosa de la bursa es bastante difícil por la presencia de estructura secundaria en el ARNbc, además de otros factores que influyen para encontrar ARN detectable como la edad del pollo y la etapa de la enfermedad.
2. La RT-PCR es una prueba que requiere de reactivos específicos y de alta calidad que deben ser usados con racionalidad, por lo tanto es necesario tener un protocolo específico para cada tipo de agente que se trabajará, y cumplir minuciosamente cada paso para obtener resultados fiables.
3. La RT-PCR es la prueba más sensible y su optimización para el diagnóstico e identificación de IBDV con los *primers* diseñados lograron obtener buenos resultados con muestras de campo, por lo tanto esta prueba sería muy eficiente con este tipo de virus pero se debe tener en cuenta todos los requerimientos mencionados para trabajar esta prueba con el IBDV
4. Para seguir con la investigación y caracterización de los nuevos brotes que aparezcan en el país es necesario continuar con la amplificación de todo el segmento A y B de IBDV, utilizando los *primers* específicos – degenerados y ajustando condiciones en la PCR de secuenciación.
5. Así como este estudio, se deben considerar todos los trabajos realizados sobre este virus en Perú, puesto que este virus puede o no, variar de región en región.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. León N. Evaluación de los niveles de protección de una vacuna intermedia contra la Enfermedad de Gumboro en pollos de postura. 2008.
2. La evolución del virus de la Enfermedad de Gumboro [Internet]. aviNews, la revista global de avicultura. 2019 [citado 26 de julio de 2019]. Disponible en: <https://avicultura.info/la-evolucion-del-virus-de-la-enfermedad-de-gumboro/>
3. Tomás G, Hernández M, Marandino A, Techera C, Grecco S, Hernández D, et al. Development of an RT-qPCR assay for the specific detection of a distinct genetic lineage of the infectious bursal disease virus. Avian Pathol. 4 de marzo de 2017;46(2):150-6.
4. Tomás G, Hernández M, Marandino A, Hernández D, Techera C, Grecco S, et al. Genome Sequence of a Distinct Infectious Bursal Disease Virus. Genome Announc [Internet]. 29 de octubre de 2015 [citado 3 de septiembre de 2018];3(5). Disponible en: <http://genomea.asm.org/lookup/doi/10.1128/genomeA.01061-15>
5. Castro-Pozo X. Evaluación de parámetros productivos y respuesta inmune en pollos de engorde vacunados con dos programas de vacunación contra la enfermedad de Gumboro. 1994.
6. Gumboro : Patogénesis [Internet]. [citado 26 de julio de 2019]. Disponible en: <http://www.enfermedad-gumboro.com/enfermedad/patogenesis.asp>
7. Gumboro : Información clínica [Internet]. [citado 26 de julio de 2019]. Disponible en: <http://www.enfermedad-gumboro.com/enfermedad/signos.asp>
8. Cookson, K. Uso del Análisis Computarizado de imágenes para establecer la ventana de infección y el tiempo apropiado para la vacunación con virus activo contra la infección de la bolsa de Fabricio. 2003.
9. Winterfield R, Hitchner S. Etiology of an infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens. Am J Vet Res. 1962;23:1273.
10. Hitchner S. Infectivity of infectious bursal disease virus for embryonating eggs. Poultry Sci. 1970;49(2):511-6.
11. Banda A. Situación global del ibd. El Libro Blanco Enferm Gumboro Girona Esp Gabinet Disseny Graf. 2006;15.
12. Allan W, Faragher J, Cullen G. Immunosuppression by the infectious bursal agent in chickens immunised against Newcastle disease. Vet Rec. 1972;90(18):511-2.
13. Chettle N, Stuart J, Wyeth P. Outbreak of virulent infectious bursal disease in East Anglia. Vet Rec. 1989;125(10):271-2.

14. Berg TPVD. Acute infectious bursal disease in poultry: a review. *Avian Pathol.* 2000;29(3):175-94.
15. Flamenco, V. Situation of infectious bursal disease virus in Central America. 2007.
16. Banda A, Villegas P, El-Attrache J. Molecular characterization of infectious bursal disease virus from commercial poultry in the United States and Latin America. *Avian Dis.* 2003;47(1):87-95.
17. Bursitis infecciosa (IBD, Gumboro) [Internet]. Hipra. [citado 23 de julio de 2019]. Disponible en: <https://www.hipra.com/portal/es/hipra/knowledge/bgdetail/infectious-bursal-disease-ibd-gumboro/infectious-bursal-disease-ibd-gumboro>
18. Villegas, P. Control de la enfermedad infecciosa de la bolsa y de la anemia infecciosa aviar. 2001.
19. Biarnés Suñé M del P. Higiene y patología aviar. 2006.
20. Lukert P, Saif Y. Infección de la bolsa de Fabricio. *Enfermedades de las aves.* 1990.
21. Gumboro : Diseminación del virus [Internet]. [citado 26 de julio de 2019]. Disponible en: <http://www.enfermedad-gumboro.com/enfermedad/diseminacion-virus.asp>
22. Vacunación contra la enfermedad de Gumboro con Cevac Transmune® [Internet]. [citado 28 de julio de 2019]. Disponible en: <https://aviplanet.com/vacunacion-contrainbd-con-cevac-transmune/>
23. Birnaviridae ~ ViralZone page [Internet]. [citado 21 de octubre de 2019]. Disponible en: https://viralzone.expasy.org/162?outline=all_by_species
24. Aquabirnavirus ~ ViralZone page [Internet]. [citado 28 de julio de 2019]. Disponible en: <https://viralzone.expasy.org/571>
25. El CSIC desvela que el virus de la bursitis infecciosa se sirve de su tamaño para aumentar su capacidad infectiva [Internet]. [citado 26 de noviembre de 2019]. Disponible en: <https://www.infosalus.com/salud-investigacion/noticia-csic-desvela-virus-bursitis-infecciosa-sirve-tamano-aumentar-capacidad-infectiva-20090120140258.html>
26. Jackwood DJ, Saif YM, Moorhead P. Immunogenicity and antigenicity of infectious bursal disease virus serotypes I and II in chickens. *Avian Dis.* 1985;1184-94.
27. Jackwood DH, Saif YM. Antigenic Diversity of Infectious Bursal Disease Viruses. *Avian Dis.* 1987;31(4):766-70.
28. Jaimes-Olaya JA, Álvarez Espejo DC, Correa JJ, Vera Alfonso VJ. Aspectos determinantes en la presentación de la enfermedad infecciosa de la bursa. *Rev Med Vet.* junio de 2009;(17):11-22.
29. Silva FMF, Vidigal PMP, Myrrha LW, Fietto JLR, Silva A, Almeida MR. Tracking the molecular epidemiology of Brazilian Infectious bursal disease virus (IBDV)

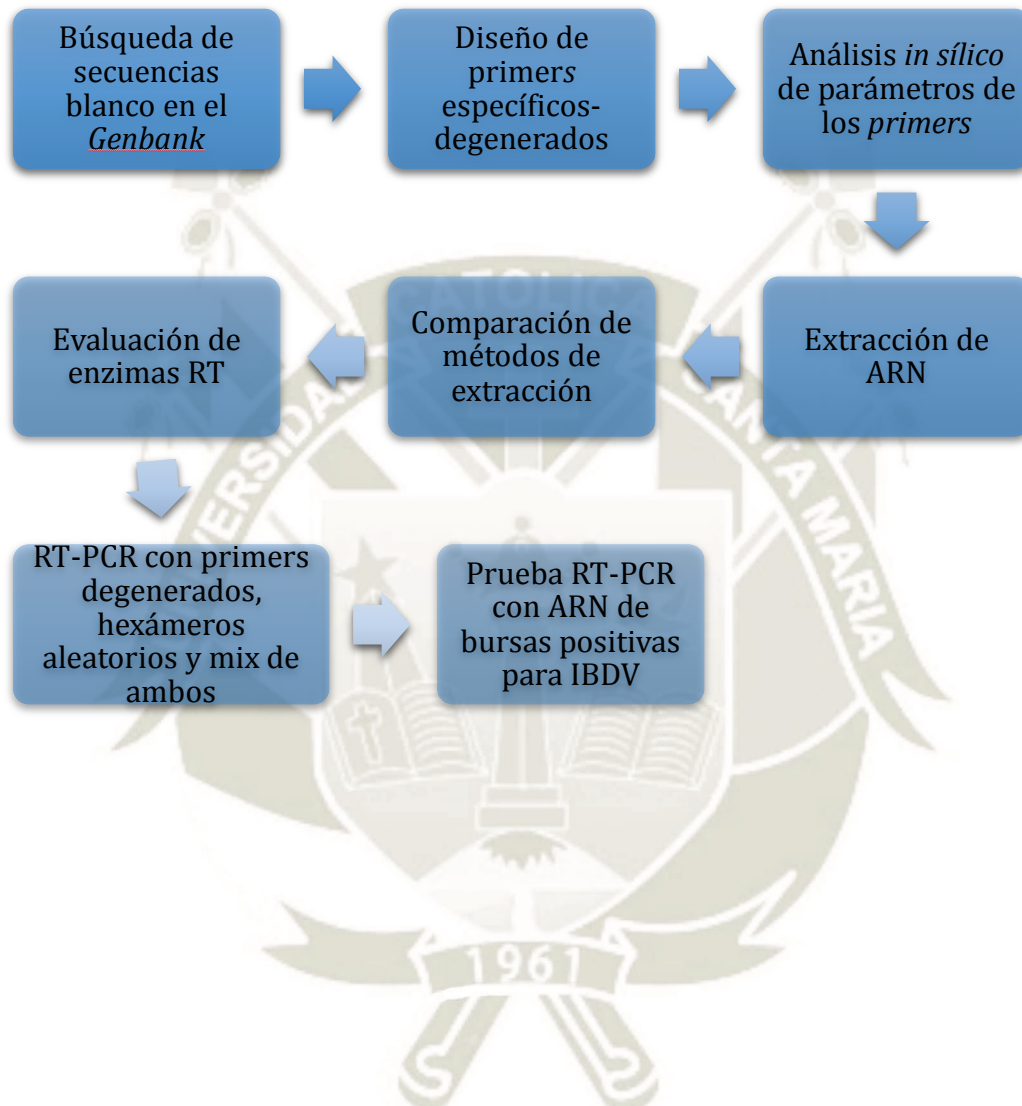
- isolates. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis.* enero de 2013;13:18-26.
30. Dr N. Etteradossi. Infectious bursal disease (Gumboro disease). En: OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. OIE Biological Standards Commission. AFSSA-site de Ploufragan/Brest, Laboratoire d'Etudes et de Recherches Avicoles, Porcines et Piscicoles (LERAPP), Unité de virologie, immunologie et parasitologie aviaires et cunicoles (VIPAC), BP 53, 22440 Ploufragan, France.; 2008. p. 2.3.12.
 31. Gomes A, Abreu J, Redondo RAF, Martins NRS, Resende J, Resende M. Genotyping of infectious bursal disease virus strains by restriction fragment length polymorphism analysis of the VP1, VP2, and VP3 genes. *Avian Dis.* 2005;49(4):500-6.
 32. Bayliss CD, Spies U, Shaw K, Peters RW, Papageorgiou A, Müller H, et al. A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2. *J Gen Virol.* junio de 1990;71 (Pt 6):1303-12.
 33. Díaz Alonso C, Garrote Santana H, Amor Vigil AM, Suárez González Y, Fernández Martínez L, Ruíz Moleón V. Nuevos métodos de extracción de ácidos ribonucleicos (ARN): herramientas básicas en la biología molecular. *Rev Cuba Hematol Inmunol Hemoter.* 28 de diciembre de 2015;31(4):466-9.
 34. Extracción de ácidos nucleicos | Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud | AccessMedicina | McGraw-Hill Medical [Internet]. [citado 26 de noviembre de 2019]. Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1473§ionid=102743658>
 35. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. *Mol Cloning Lab Man* [Internet]. 1989 [citado 26 de noviembre de 2019];(Ed. 2). Disponible en: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19901616061>
 36. Virus DNA/RNA Extraction Kit II VR050/VR100/VR300 | Geneaid [Internet]. [citado 17 de agosto de 2019]. Disponible en: <http://www.geneaid.com/products/virus-rna/viral-rna-dna-extraction-kit-ii>
 37. GENEzol™ Reagent (GZR050/GZR100/GZR200) | Geneaid [Internet]. [citado 17 de agosto de 2019]. Disponible en: <http://www.geneaid.com/products/tri-rna-extraction/gene-zol-reagent-rna-extraction>
 38. Bolivar AM, Rojas A, Garcia Lugo P. PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Av En Biomed* [Internet]. 2014 [citado 15 de julio de 2018];3(1). Disponible en: <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=331330398005>
 39. L T de D, C I, C V. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investig En Discapac.* 2013;2(2):70-8.
 40. Ohan NW, Heikkila JJ. Reverse transcription-polymerase chain reaction: An overview of the technique and its applications. *Biotechnol Adv.* 1 de enero de 1993;11(1):13-29.

41. Técnicas de biología molecular II [Internet]. [citado 26 de noviembre de 2019]. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/dermatologia/v09_sup1/tecnicas_2.htm
42. Shors T. Virus: Estudio Molecular Con Orientacion Clinica/ Molecular Study With Clinical Orientation. Ed. Médica Panamericana; 2009. 672 p.
43. Smith MD, Potter RJ, Dhariwal G, Gerard GF, Rosenthal K. Transcriptasas inversas termoestables y usos de las mismas [Internet]. ES2578634T3, 2016 [citado 26 de noviembre de 2019]. Disponible en: <https://patents.google.com/patent/ES2578634T3/es>
44. Random Primer Mix | NEB [Internet]. [citado 26 de noviembre de 2019]. Disponible en: <https://www.neb.com/products/s1330-random-primer-mix>
45. Reverse Transcription Setup | Thermo Fisher Scientific - PE [Internet]. [citado 21 de julio de 2019]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/pe/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/rt-education/reverse-transcription-setup.html>
46. Basic Principles of RT-qPCR - PE [Internet]. [citado 18 de noviembre de 2019]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/ht/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/spotlight-articles/basic-principles-rt-qpcr.html>
47. Suarez RA. Diseño de Cebadores degenerados para la amplificación del gen de prolactina en peces perciformes. :44.
48. Arif M, Ochoa-Corona FM. Comparative Assessment of 5' A/T-Rich Overhang Sequences with Optimal and Sub-optimal Primers to Increase PCR Yields and Sensitivity. Mol Biotechnol. 2012;55:17-26.
49. Jonas S. " PRIMERS: DEFINICIÓN, CRITERIOS DE SELECCIÓN Y DISEÑO " [citado 18 de noviembre de 2019]; Disponible en: https://www.academia.edu/28667914/_PRIMERS_DEFINICI%C3%93N_CRITERIOS_DE_SELECCI%C3%93N_Y_DISE%C3%91O_
50. How do I use the OligoAnalyzer tool to analyze possible hairpins and dimers formed by my oligo? [Internet]. [citado 16 de noviembre de 2019]. Disponible en: <https://www.idtdna.com/pages/support/faqs/how-do-i-use-the-oligoanalyzer-tool-to-analyze-possible-hairpins-and-dimers-formed-by-my-oligo>
51. Cuantificación y almacenamiento de ARN [Internet]. [citado 19 de noviembre de 2019]. Disponible en: <http://www.molecularcloning.com/index.php?prt=71>
52. Sci-Hub | NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. Journal of Visualized Experiments, (-1) | 10.3791/2565 [Internet]. [citado 18 de noviembre de 2019]. Disponible en: <https://sci-hub.se/10.3791/2565>
53. Tomás G, Hernández M, Marandino A, Panzera Y, Maya L, Hernández D, et al. Development and validation of a TaqMan-MGB real-time RT-PCR assay for

- simultaneous detection and characterization of infectious bursal disease virus. *J Virol Methods*. octubre de 2012;185(1):101-7.
54. Rodríguez Sánchez IP, Barrera Saldaña HA. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Cienc UANL* [Internet]. 2004 [citado 17 de agosto de 2019];7. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/1584/>
 55. Eterradossi N, Arnauld C, Toquin D, Rivallan G. Critical amino acid changes in VP2 variable domain are associated with typical and atypical antigenicity in very virulent infectious bursal disease viruses. *Arch Virol*. 1 de julio de 1998;143(8):1627-36.
 56. Le Nouën C, Rivallan G, Toquin D, Darlu P, Morin Y, Beven V, et al. Very virulent infectious bursal disease virus: reduced pathogenicity in a rare natural segment-B-reassorted isolate. *J Gen Virol*. enero de 2006;87(Pt 1):209-16.
 57. Carbajal A. Extracción y purificación de ADN. *Mater Methods Es* [Internet]. 24 de mayo de 2018 [citado 22 de noviembre de 2019]; Disponible en: </method/DNA-Extraction-and-Purification.html>
 58. Vermeulen J, De Preter K, Lefever S, Nuytens J, De Vloed F, Derveaux S, et al. Measurable impact of RNA quality on gene expression results from quantitative PCR. *Nucleic Acids Res*. mayo de 2011;39(9):e63.
 59. How to Choose the Right Reverse Transcriptase [Internet]. [citado 18 de julio de 2019]. Disponible en: <https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/choosing-the-right-reverse-transcriptase/>
 60. Muniz EC, Verdi R, Jackwood DJ, Kuchpel D, Resende MS, Mattos JCQ, et al. Molecular epidemiologic survey of infectious bursal disease viruses in broiler farms raised under different vaccination programs. *J Appl Poult Res*. 1 de junio de 2018;27(2):253-61.
 61. Dias CCA, de Oliveira Souza F, da Silva EMSA, Eller MR, Barrios PR, dos Santos BM, et al. Sequencing and phylogenetic analysis of the infectious bursal disease virus isolates from outbreak in layer flocks in the state of Minas Gerais. *Braz J Microbiol*. 2009;40(1):205-7.

ANEXOS

ANEXO 1. Flujograma de desarrollo de RT-PCR universal para IBDV con primers específicos - degenerados.



ANEXO 2. Medición en el espectrofotómetro NanoDrop One de THERMO SCIENTIFIC para ácidos nucleicos

❖ Para medir ácidos nucleicos

1. En la pantalla Inicio, seleccione la ficha **Ácidos nucleicos** y toque **ADNbc**, **ADNmc** o **ARN**, según las muestras que necesite medir.

2. Especifique una corrección de línea base si lo desea.

3. Pipetee 1–2 µl de solución blanco en el pedestal inferior y baje el brazo, o introduzca la cubeta de blanco en el portacubetas.

Sugerencia: Si utiliza una cubeta, asegúrese de alinear la trayectoria del haz de la cubeta con la del instrumento.

4. Toque **Blanco** y espere a que termine la medición.

Sugerencia: Si Blanqueo automático está activado, la medición de blanco comienza automáticamente al bajar el brazo. Esta opción no está disponible para las mediciones en cubeta.

5. Levante el brazo y limpie ambos pedestales con una roallita para laboratorio nueva, o retire la cubeta de blanco.

6. Pipetee 1–2 µl de solución de muestra en el pedestal y baje el brazo, o introduzca la cubeta de muestra en el portacubetas.

7. Comience la medición de la muestra.

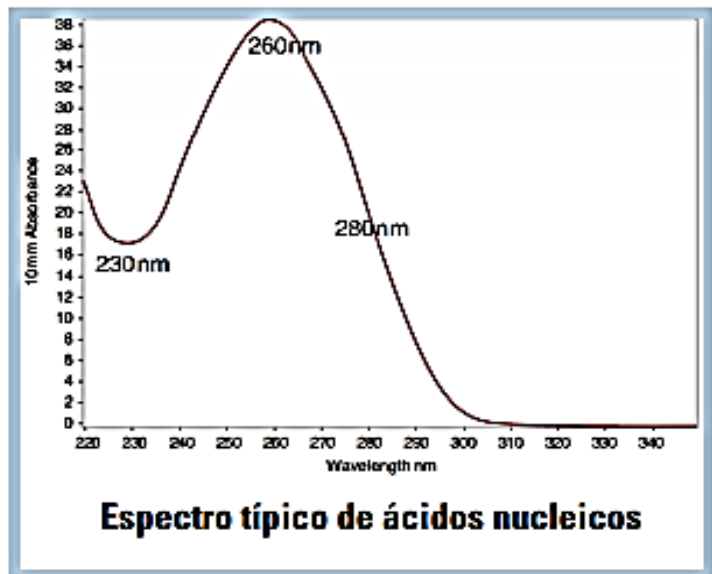
– **Pedestal:** Si Medición automática está activado, baje el brazo; si está desactivado, baje el brazo y toque **Medición**.

– **Cubeta:** Toque **Medición**.

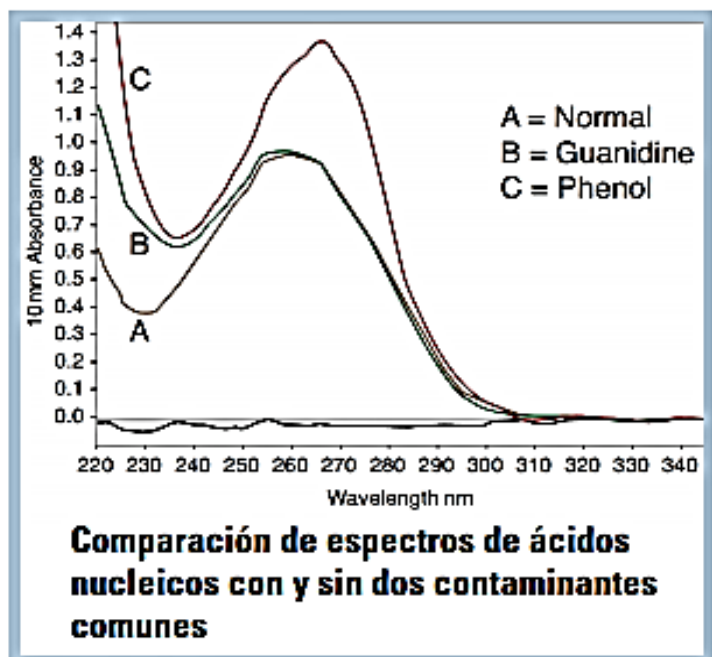
Cuando termina la medición de la muestra, aparecen el espectro y los valores proporcionados (consulte la sección siguiente).

8. Cuando haya terminado de medir muestras, toque **Finalizar experimento**.

9. Levante el brazo y limpie ambos pedestales con una roallita nueva, o retire la cubeta de muestras.



Espectro típico de ácidos nucleicos



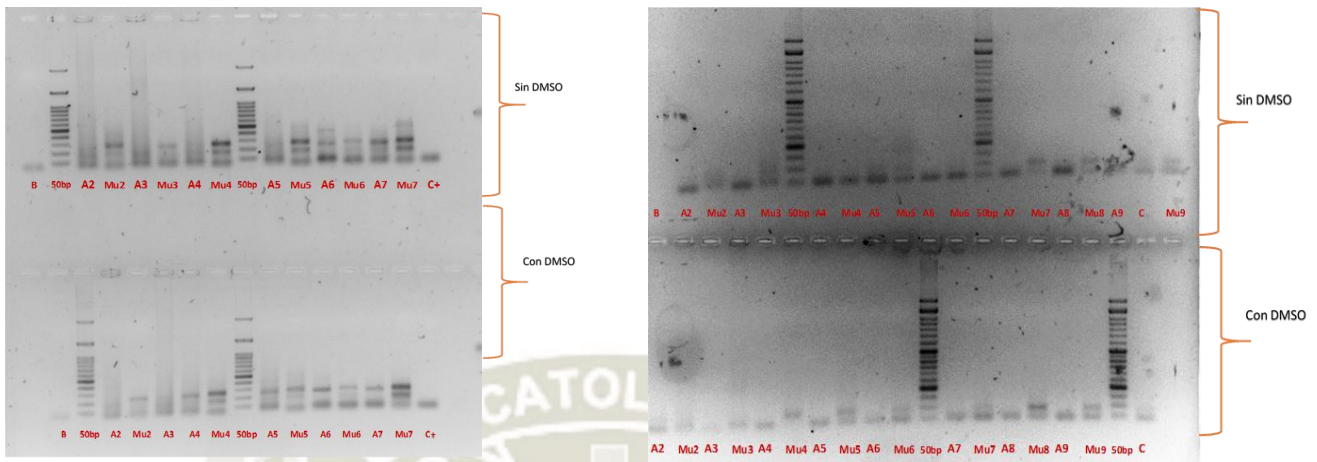
Comparación de espectros de ácidos nucleicos con y sin dos contaminantes comunes

ANEXO 3. Cuantificación de ARN extraído con Genezol y Kit Geneaid en el espectrofotómetro.

Nombre de muestra	ARN (ng/uL)	A260/A280	A260/A230	Impureza 1	Impureza 1 A260	Impureza 1 %CV
KIT con carrier	425,356	2,132	2,142			
KIT con carrier	426,270	2,128	2,147			
KIT con carrier	432,173	2,135	2,170			
KIT sin carrier	338,110	2,127	2,160			
KIT sin carrier	341,924	2,133	2,176			
KIT sin carrier	245,111	2,108	2,056			
Genezol	534,325	1,983	1,417			
Genezol	536,323	1,994	1,401			
Genezol	567,674	2,036	1,371			
Genezol	385,960	1,918	0,535	Fenol	1,226	5,65
Genezol	384,366	1,912	0,545	Fenol	1,264	5,08
Genezol	384,495	1,914	0,534	Fenol	1,259	5,21
Genezol	251,283	1,965	1,959	Fenol	0,679	9,22
Genezol	258,061	1,959	1,933	Fenol	0,703	8,29
Genezol	257,306	1,963	1,983	Fenol	0,693	9,34

ANEXO 4. Electroforesis en gel de agarosa de las repeticiones de las pruebas

- Comparación de enzimas retrotranscriptasas y uso de DMSO



- Comparación entre los primers específicos degenerados y hexámeros aleatorios

