



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias de la Vida

“DISEÑO DE UNA HERRAMIENTA BIOLÓGICA PARA DETERMINAR LA EFECTIVIDAD DE LA VACUNACIÓN CONTRA LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE EN LA INDUSTRIA AVÍCOLA ECUATORIANA”

INFORME DE PROYECTO INTEGRADOR

Previa a la obtención del Título de:

BIOLOGO

Angie Belén Mera Román

Wendy Natividad Sánchez Cabezas

GUAYAQUIL – ECUADOR

AÑO: 2017 - 2018

AGRADECIMIENTOS

Queremos dar las gracias de corazón, a Dios por habernos permitido completar una etapa súper importante en nuestras vidas.

A nuestros padres Guillermo, Natividad, Nelson y María Elena por apoyarnos en todo momento y brindarnos ese amor incondicional, gracias por ser un buen ejemplo para nosotras e impulsarnos a ser mejores cada día.

A nuestros hermanos/as quienes soportaron todo nuestro mal humor, pero aun así siempre estuvieron a nuestro lado dándonos esas palabras de aliento para seguir adelante.

A nuestros tutores,

PhD. Washington Cárdenas por su guía, paciencia, dedicación, y criterio para con nosotras.

Blgo. Lex Medina por sus charlas magistrales que con dedicación y algo de humor nos ayudó a entender temas que para nosotras parecían imposibles.

Agradecemos al Laboratorio de Investigaciones Biomédicas por los meses de aprendizaje brindados.

Por último y no menos importante, gracias a todos nuestros compañeros y amigos, en especial Freddy que formó parte fundamental durante esta etapa y con quien compartimos los buenos y malos momentos de nuestra carrera universitaria.

DEDICATORIA

Quiero dedicar este proyecto a mi madre quien siempre me ha brindado su apoyo, seguridad y confianza en todo momento.

A mi padre por ser un pilar fundamental en mi vida y ayudarme a cumplir esta meta que parecía difícil.

Y a una persona muy especial, mi abuelita Angela Reyes, que aunque ya no se encuentra conmigo siempre la recordaré.

-Wendy

Este proyecto va dedicado a mis padres que me han apoyado en un 110% para alcanzar esta meta, espero de todo corazón haberlos enorgullecido.

Y al pequeño Chris por siempre sacarme una sonrisa en momentos inesperados y estar a mi lado siempre.

-Angie

EVALUADOR DEL PROYECTO

.....
Washington B. Cárdenas, Ph.D.

Tutor Proyecto Integrador

.....
Diego Gallardo, M.Sc.

Profesor Materia Integradora

.....
Blgo. Lex G. Medina Magües

Co-Tutor Proyecto Integrador

DECLARACIÓN EXPRESA

"La responsabilidad y la autoría del contenido de este Trabajo de Titulación, nos corresponde exclusivamente; y damos nuestro consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual"

.....
Angie Belén Mera Román

.....
Wendy Natividad Sánchez Cabezas

RESUMEN

La enfermedad de Newcastle (ND) es provocada por un agente infeccioso de gran importancia para las industrias avícolas a nivel mundial. Puede estar presente en más de 200 especies de aves y puede llegar a ser 100% letal dependiendo de la patogenicidad de la cepa viral que las infecte. Dicho virus actualmente no ha sido erradicado de Ecuador, por lo que representa un factor de riesgo para la industria avícola ecuatoriana.

A pesar de la vacunación periódica que utiliza el país como medida de bioseguridad, hasta la fecha el Ecuador no posee estudios epidemiológicos sistemáticos acerca de la evolución del virus y la evaluación de las vacunas que se utilizan. Además, se ha demostrado que los métodos usados para el análisis de efectividad de las vacunas contra el ND son inespecíficos. Es importante tener un método sensible y específico para cuantificar los anticuerpos neutralizantes contra NDV y asegurar la debida protección de las aves contra la enfermedad. Por esta razón, el presente proyecto propone un método de evaluación sensible, específico, rápido y cuantitativo de la vacunación contra Newcastle, mediante un ensayo de neutralización con un virus de Newcastle recombinante.

Para esto, se generará un modelo de virus de Newcastle recombinante con la cepa «La Sota», en donde se insertará, individualmente, dos genes reporteros: eGFP (Proteína Verde Fluorescente mejorada) y Nanoluc (Nano luciferasa). Este modelo permitirá mejorar el ensayo de neutralización, ya que el gen exógeno se utilizará para reportar rápida y cuantitativamente la capacidad de anticuerpos de pollo de inhibir la infección de un cultivo celular. A diferencia de los ensayos de inhibición de hemaglutinación, el presente modelo ofrece una manera real y específica de evaluar la bondad de las vacunas para generar anticuerpos neutralizantes y, de esta manera, ajustar los protocolos de vacunación

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
EVALUADOR DEL PROYECTO	iv
RESUMEN	vi
ÍNDICE GENERAL.....	vii
ABREVIATURA.....	ix
ÍNDICE DE FIGURA	x
ÍNDICE DE TABLAS	xi
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1: Marco Teórico	3
1.1 Situación actual e importancia del proyecto.....	3
1.2 Información general del virus de la enfermedad de Newcastle	4
1.2.1 Clasificación	4
1.2.2 Genoma del Virus de Newcastle	6
1.2.3 Ciclo viral.....	8
1.2.4 Desarrollo de la enfermedad	9
1.3 Prevención y control.....	10
1.4 Serología	11
1.4.1 Inhibición de Hemaglutinación (HI).....	11
1.4.2 Ensayo de Neutralización	12
1.5 Genética inversa y sistema de rescate.....	12
CAPÍTULO 2: Materiales y Métodos	13
2.1 Virus NDV, cepa «La Sota».....	13
2.2 Gen Reportero	15
2.2.1 Enhanced Green Fluorescent Protein	15
2.2.2 Nano Luciferasa	16
2.3 Plásmidos.....	16
2.4 Extracción de ARN.....	16
2.5 Síntesis de ADN complementario.....	17
2.6 Análisis de restricción	17

2.7	Amplificación por PCR	18
2.8	Clonación molecular.....	18
2.8.1	Ensamblaje en plásmido.....	18
2.8.2	Transformación	19
2.8.3	Comprobación de inserto y purificación de plásmido.....	19
2.9	Secuenciación	19
2.10	Cultivo celular y Transfección en células	20
2.11	Cuantificación o titulación	20
2.11.1	Ensayo de placas.....	20
2.12	Medición de la respuesta serológica a las vacunas.....	21
2.12.1	Inhibición de la multiplicación viral o Neutralización	21
CAPÍTULO 3: Resultados y Discusión		23
3.1	Resultados	23
3.1.1	Modelo de virus recombinante.....	23
3.1.2	Ensayo de Neutralización con virus recombinante	25
3.2	Discusión.....	26
CONCLUSIONES		29
BIBLIOGRAFÍA		30
ANEXOS		34
Anexo 1. Plásmido de expresión con Proteína Verde Fluorescente.....		34
Anexo 2. Plásmido de expresión con Nano Luciferasa.....		35
Anexo 3. Plásmidos auxiliares		36
Anexo 4. Protocolo de Ensayo de Neutralización.....		37

ABREVIATURA

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
APMV	Paramyxovirus aviar
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
CONAVE	Corporación Nacional de Avicultores del Ecuador
eGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein (Proteína verde fluorescente mejorada)
ESPAC	Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua
F	Proteína de Fusión
HN	Proteína Hemaglutinina-neuraminidasa
kb	Kilobase
kDa	KiloDalton
L	ARN Polimerasa
M	Proteína de Matriz
MAG	Ministerio de Agricultura y Ganadería
NDV	Newcastle Disease Virus (Virus de la enfermedad de Newcastle)
NLuc	NanoLuc Luciferase (NanoLuc Luciferasa)
NP	Nucleoproteína
P	Fosfoproteína
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción de la cadena polimerasa)
PIB	Producto Interno Bruto
ssARN	ARN monocatenario, simple cadena
UPAs	Unidades de Producción Agropecuaria

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1. Organización genómica del Virus de Newcastle.	6
Figura 2. Representación de un modelo simplificado del virus de NDV.....	7
Figura 3. Ciclo infeccioso de Virus de Newcastle	9
Figura 4. Diagrama de Flujo de la Construcción del virus recombinante	14
Figura 5. Sitios de restricción SapI en el genoma del virus de Newcastle	17
Figura 6. Esquema de ensayos para la cuantificación e inhibición de partículas virales.....	21
Figura 7. Inserción de los genes reporteros.....	23
Figura 8. Modelos de virus recombinante fluorescente eGFP de color verde (Izquierda) o luminiscente Nanoluc de color azul (derecha).....	24
Figura 9. Representación gráfica del ensayo de neutralización en una vacuna eficiente.....	25
Figura 10. Representación gráfica del ensayo de neutralización en una vacuna eficiente.....	26
Figura 11. Comparación de ensayo de neutralización (NT) convencional con eGFP-NT y HI de 57 muestras de suero de pollo	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Clasificación de los serotipos de Paramyxovirus Aviar.	4
Tabla II. Clasificación del APMV 1.	5

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Newcastle (ND) se encuentra situada entre las patologías de aves que presentan mayor relevancia a nivel global [1]. De acuerdo a la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), esta enfermedad puede alcanzar una tasa de mortalidad de hasta el 100% en aves no vacunadas[2]. Debido a esto muchos países mantienen estrictas medidas de bioseguridad, que incluyen la vacunación[3]. Las cepas más comunes que se utilizan en las vacunas son la B1 y «La Sota» [1], debido a su baja patogenicidad.

En Ecuador, los últimos brotes de la enfermedad fueron en los años 2000 y 2001 [3]. Desde entonces la vacunación contra ND se mantiene de forma periódica para evitar cualquier epizootia ya que la industria avícola representa el 23.1% del PIB agropecuario. Aunque esta práctica reduce el desarrollo de la enfermedad y tasa de mortalidad, el virus de la ND (NDV) silvestre todavía puede infectar, replicarse y excretarse del ave vacunada [4].

En el 2015 se reportó el primer estudio sistemático de NDV en Ecuador, donde se encontró que el 49,7% de las aves muestreadas presentaban anticuerpos contra NDV [5]. Además, el mismo reporte encontró que el 10.71% de las aves presentaban material genético viral, mediante el diagnóstico por RT-PCR.

El ND proviene de un virus de ARN monocatenario negativo, miembro de la familia *Paramyxoviridae*, del género *Avulavirus* [6,7]. Según la susceptibilidad del huésped y la cepa viral que los infecte, este virus provoca problemas del sistema respiratorio, tracto gastrointestinal y sistema nervioso [8, 9,10]. El NDV o paramyxovirus aviar del serotipo 1 (APMV-1) puede afectar a 200 especies diferentes de aves [3,8], ocasionando grandes pérdidas económicas en la industria avícola.

Según AGROCALIDAD (Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro), uno de los principales problemas que tienen algunos productores de la industria avícola ecuatoriana, son los limitados estudios epidemiológicos sistemáticos de las enfermedades presentes en las aves de corral [1]. No se conoce la evolución genética de los virus silvestres de NDV y su relación antigénica con la cepa vacunal utilizada [1].

Los métodos utilizados evaluar la efectividad de las vacunas contra NDV se basan en ensayos tipo ELISA e inhibición de la hemaglutinación. Estos métodos tienen problemas de inespecificidad y son muy pobres para detectar niveles bajos de anticuerpos [11]. Es necesario implementar un método sensible y específico para cuantificar los anticuerpos neutralizantes contra NDV, para determinar con mayor precisión la protección efectiva contra la enfermedad [11,12].

En base a los antecedentes expuestos, el presente proyecto ofrece un método de evaluación sensible, específico, rápido y cuantitativo para evaluar la efectividad de las vacunas comerciales contra ND, mediante un ensayo de neutralización con un virus de Newcastle recombinante, que expresa dos genes reporteros. Para lograr este objetivo se debe cumplir los siguientes pasos:

1. Construir un modelo del virus de Newcastle recombinante que exprese individualmente dos genes reporteros, como la proteína verde fluorescente mejorada (eGFP) y la nano luciferasa (NanoLuc).
2. Desarrollar un protocolo de infección in vitro para la evaluación de anticuerpos neutralizantes contra Newcastle, mediante el uso de NDV recombinante.

CAPÍTULO # 1

MARCO TEÓRICO

1.1 Situación actual e importancia del proyecto

La industria avícola representa una actividad muy importante del sector agroindustrial, la cual en las últimas dos décadas ha crecido exponencialmente hasta convertirse en una de las fuentes más significativas de la economía ecuatoriana.

Según los reportes del censo realizado por el MAG y ESPAC del 2016, el país posee alrededor de 14,307 millones de cabezas de gallos y gallinas y 34,964 millones de pollitos y pollos de engorde [13,14]. El consumo anual de esta proteína animal ha aumentado continuamente en el país. Se estima un consumo de 30 y 32 kilogramos por persona al año y de 140 unidades de huevos por persona al año [15,16].

Debido a la gran demanda e importancia de los productos avícolas en la dieta de la población ecuatoriana, es de vital importancia mantener un estricto control sanitario en la cadena de producción que se encuentra destinada al consumo. Dentro de estos, las enfermedades infecciosas y su control representan los rubros más importantes para el productor [17].

Entre las enfermedades relevantes que afectan a las aves en el Ecuador, encontramos: Enfermedad de Gumboro, Salmonelosis aviar, Bronquitis infecciosa aviar, Pneumovirus aviar y la enfermedad de Newcastle [17]. Esta última es conocida por actuar como barrera de exportación, la cual impide a los productores llegar a los mercados internacionales más competitivos.

1.2 Información general del virus de la enfermedad de Newcastle

1.2.1 Clasificación

La familia *Paramyxoviridae* del género *Avulavirus* está clasificada en 11 serotipos (Tabla 1), de acuerdo a su afinidad antigénica. Esta división está basada en ensayos de inhibición de hemaglutinación [18].

Tabla I. Clasificación de los serotipos de Paramyxovirus Aviar. Imagen modificada de C. Valladares [21]

SEROTIPOS	HOSPEDERO	ORIGEN
APMV 1	Más de 200 especies de aves	Newcastle-Upon-Tyne
APMV 2	Pollos	California/ Yucaipa
APMV 3	Pavos	Wisconsin
	Psitácidas	Netherlands
APMV 4	Patos, pollos y gansos	Hong Kong
APMV 5	Periquitos y cotorras	Japón
APMV 6	Patos, gansos y pavos	Hong Kong
APMV 7	Palomas	Tennessee
APMV 8	Gansos	Delaware
APMV 9	Patos domésticos	New York
APMV 10	Pingüinos	Islas Malvinas
APMV 11	Agachadiza común	Francia

El paramyxovirus aviar tipo 1 (APMV 1) corresponde al virus de la ND y está subdividido en 2 clases, de acuerdo a su relación genética (Tabla 2). La clase I está formada generalmente por virus de baja patogenicidad y se encuentran en aves acuáticas silvestres. Por otro lado, la clase II lo conforman la mayoría de las cepas de APMV 1, los cuales se dividen en nueve genotipos separados por la virulencia y tipo de huésped [19].

Tabla II. Clasificación del APMV 1. Imagen modificada de *J. Wang et al.*, [19]

SEROTIPO	CLASE	GENOTIPO	CEPA	TIPO DE AVE
APMV 1 (Enfermedad de Newcastle)	I	la	NDV08-004	Silvestres
		lb	NDV09-014	
		lc	Gx1261	
	II	I	Ulster 2C	Domésticas y Silvestres
		II	La Sota, B1, F	
		III	Mukteswar	
		IV	Hertz 33/56	
		V	Anhinga/U.S.(FI)/44083/93	
		VI	Pigeon/Yunnan/11111/2013	
		VII	ZJ1	
		VIII	QH1	
IX	F48E8			

Otra clasificación de las cepas de APMV 1 es por su grado de patogenicidad o el tiempo requerido para que el virus mate a los embriones de aves [20], las cuales se han clasificado en 3 grupos:

- *Cepas velogénicas:* como Hertz 33/56, Milano, ESSEX 70 y NY Parrot 70181. Son cepas de alta virulencia que presenta mortalidad del 100% en aves [21] y llegan a matar a embriones en 40 a 60 horas.
- *Cepas mesogénicas:* como Mukteswar, Roakin, Komarov y H. Son cepas de virulencia media por lo cual pueden matar a un embrión de ave en un rango de 60 y 90 horas. A pesar de eso muchas de estas cepas son usadas para producir vacunas.
- *Cepas lentogénicas:* como Clona 30, Hitchner B1, «La Sota» y F. Son cepas de baja virulencia, con bajo índice de patogenicidad intracerebral, y ampliamente utilizadas en la fabricación de vacunas [22]. Algunas de estas

cepas no provocan muerte embrionaria, mientras que otras pueden matar al embrión en > 90 horas.

En muchos países, la cepa más usada para la fabricación de vacunas es «La Sota» por su alta capacidad de multiplicación en tejidos, generando respuesta inmune y protección eficiente. En Ecuador la única cepa registrada para la fabricación de vacunas es «La Sota».

1.2.2 Genoma del Virus de Newcastle

Este virus en particular mide de 120 a 180nm y posee un genoma lineal de ARN monocatenario (ssRNA), de polaridad negativa, con una tamaño de aproximadamente 15 kb [6,7,22,23]. El ARN genómico posee la particularidad de replicarse cuando el tamaño de su genoma es múltiplo de seis [24].

Esta partícula viral de cadena simple, contiene 6 unidades transcripcionales (3'-NP-P-M-F-HN-L-5') [25], que codifican proteínas estructurales y no estructurales importantes para la replicación viral. Los extremos del genoma viral se encuentran flanqueados por regiones no codificantes denominadas «*Leader*» (en 3') y «*Trailer*» (en 5'). Cada una de ellas cumple funciones específicas en la infección viral (Fig. 1).



Figura 1. Organización genómica del Virus de Newcastle.

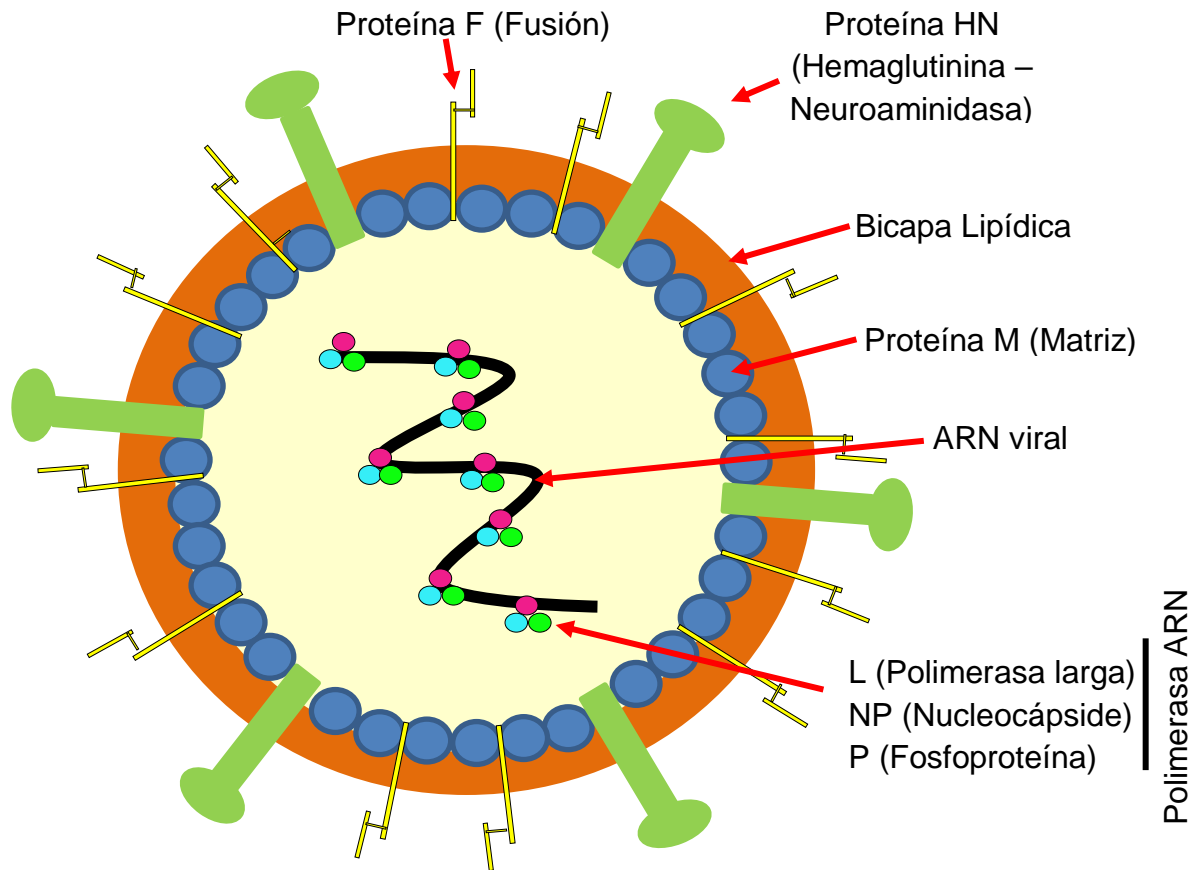


Figura 2. Representación de un modelo simplificado del virus de NDV

La Nucleoproteína (NP), participa en los procesos de encapsidación, transcripción y replicación viral, además junto con la Fosfoproteína (P) y el ARN Polimerasa forma la nucleocápside [26,27].

El virus posee una envoltura de membrana lipoproteica, a la cual están asociadas la proteína de Matriz (M) que recubre la superficie interna de la membrana, y las dos glicoproteínas: fusión (F) y Hemaglutinina-neuraminidasa (HN), que forman las estructuras de espículas superficiales de los viriones (Fig. 2). La matriz juega un rol

relevante en la liberación de los viriones, mientras que las proteínas HN y F son esenciales para iniciar la infección viral [9,27]. Estas glicoproteínas trabajan en conjunto para promover el ingreso del virus a la célula [28]. Además, la hemaglutinina-neuraminidasa tiene otras funciones como la de reconocer y eliminar al receptor de la célula huésped [28].

El gen P genera dos ARNm adicionales debido a la adición de una o dos guaninas, para producir las proteínas V y W respectivamente. Estos transcritos adicionales resultan de la adición de nucleótidos no presentes en la cadena molde, debido a un efecto de falsa parada de la polimerasa cuando transcribe el gen P [25,27].

1.2.3 Ciclo viral

El ciclo de NDV empieza por la adsorción de la partícula viral a la membrana celular (paso 1 - Fig. 3). La proteína HN, responsable del reconocimiento de receptores específicos de la superficie celular, juega un rol importante en dicha unión [22]. Con la adherencia del paramyxovirus a la célula, la proteína F se activa a causa de un cambio en la estructura de la Hemaglutinina-neuraminidasa (HN), lo que provoca la unión de la membrana celular con la membrana viral, liberando así el ARN vírico (paso 2 - Fig. 3).

La transcripción de NDV se realiza en el citoplasma (paso 3 - Fig. 3), aparentemente sin necesidad de un iniciador celular. Durante la replicación del genoma (paso 4 – Fig. 3) se sintetiza una copia positiva del ARN genómico. Este se utiliza de molde para generar más copias genómicas virales y de estas últimas se transcriben los ARNm para producir las proteínas virales.

Las proteínas virales NP, P y L son las mínimas necesarias para replicar y transcribir el genoma viral. Mientras se produce el ensamblaje y liberación de viriones (paso 5 – Fig. 3), las proteínas F y HN sufren modificaciones postraduccionales. Una

particularidad del ciclo viral de los paramyxovirus, es poder infectar a células vecinas sin necesidad de salir al medio extracelular.

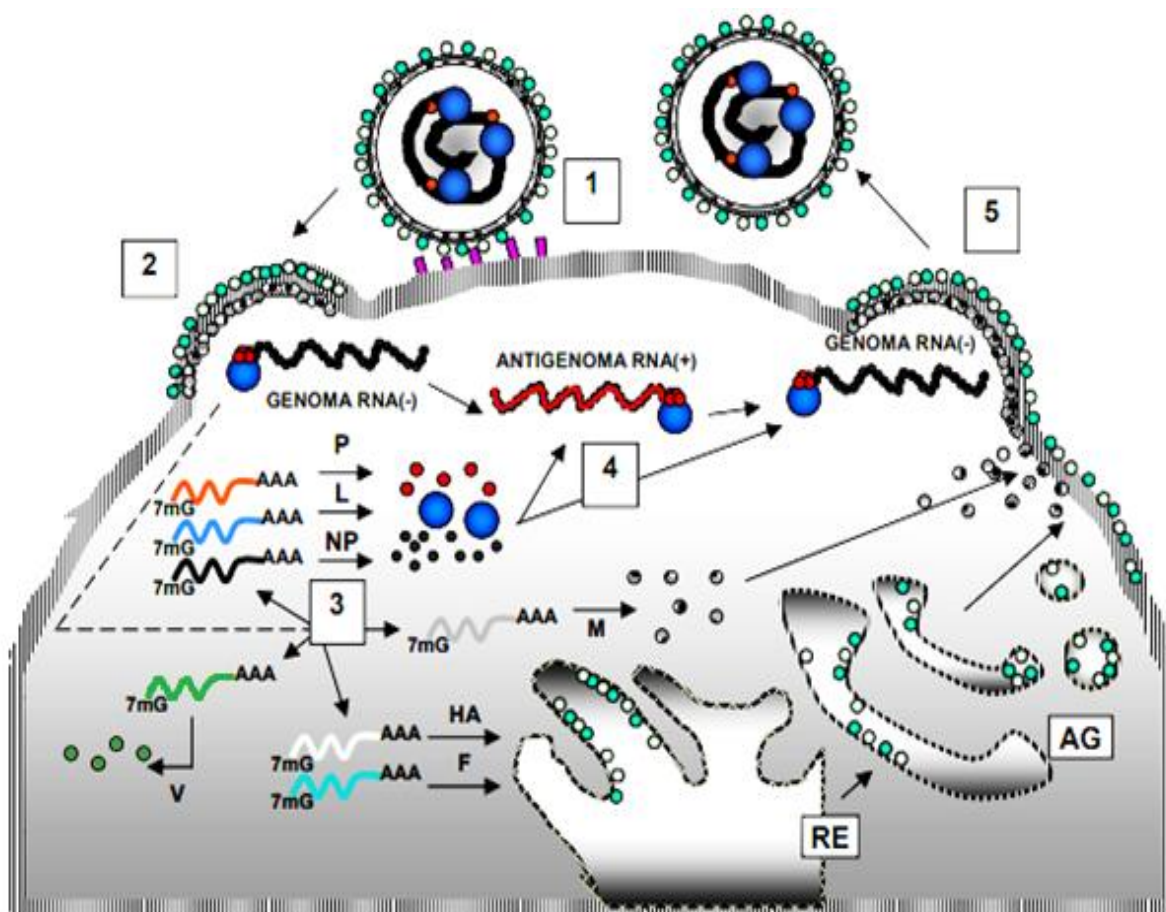


Figura 3. Ciclo infeccioso de Virus de Newcastle. Imagen original de J. Ayllón [27]

1.2.4 Desarrollo de la enfermedad

Newcastle es una enfermedad altamente infecciosa, transmitiéndose por contacto directo con las aves portadoras del virus [9]. Tiene un periodo de incubación de 2 y 15 días [29], dependiendo de la cepa viral que las infecte, aunque datos de la OIE aseguran que el tiempo de incubación puede durar hasta 21 días [30]. Durante esta etapa, las aves transmiten el virus por medio de sus heces y descargas respiratorias [9]. La eliminación del virus por vía fecal u oral se da entre 1 y 2 semanas, prolongándose hasta varios meses [29].

Una vez finalizado el periodo de incubación, empieza la fase de desarrollo en donde aparecen los síntomas. Estos dependen de la edad del animal, la vía de infección y el estado inmune del hospedero. En las aves juveniles la enfermedad se presenta en forma aguda y se observan diferentes síntomas como: disnea, espasmos musculares, debilidad, pérdida de apetito y otros signos clínicos a nivel del tracto digestivo y sistema nervioso [8].

La última fase se puede presentar la convalecencia o la muerte del animal. En una parvada de aves infectadas se puede registrar una mortalidad del 100% o ser asintomática. Esto va a depender de la cepa viral causante de la infección [29].

1.3 Prevención y control

Las principales medidas que se utilizan para prevenir y controlar ND, son la higiene y bioseguridad. Esta última está entre las mejores opciones de control primario que tienen los avicultores, pero por sí sola no es suficiente para la protección de la industria avícola moderna [1,31]. Es por esto que la implementación de medidas como la inmunización de las aves, por vacunación, es un requisito fundamental para mantener el buen estado de las granjas avícolas, proporcionándoles protección frente al virus en estado silvestre.

En cuanto a la inmunización, se puede utilizar vacunas vivas, vacunas inactivadas y vacunas recombinantes [31]. El uso de estas vacunas dependerá de factores como el tipo y edad del ave y las condiciones locales [31].

La inmunidad se genera las aves a través de los linfocitos T y B. Esta última generan los anticuerpos que reducen o inhiben la infección [32].

En cuanto al factor de eficacia de las vacunas, se necesita varios ensayos de prueba y error, acompañado de un seguimiento del virus como de las aves. El problema que posee el país, es que no existe un seguimiento epidemiológico continuo posterior a la vacunación, teniendo poca información de la evolución del virus a través de los años.

Debido al mínimo entendimiento sobre el desarrollo evolutivo del virus dentro del país, hace que surjan dudas sobre si los animales que consumimos a diario, están debidamente protegidos contra el virus del NDV. Por eso, es esencial que cualquier tipo de vacuna usada para controlar la diseminación de este virus, deba ser sometida a pruebas serológicas, capaces de determinar la efectividad de la vacunación, seguido de un seguimiento clínico y epidemiológico continuo.

1.4 Serología

La serología es la ciencia que comprueba la presencia de anticuerpos determinados en la sangre. En la actualidad, existen diferentes pruebas serológicas usadas para evaluar y controlar la eficiencia en las vacunas, entre ellas se encuentran:

1.4.1 Inhibición de Hemaglutinación (HI)

Este tipo de ensayos se los requieren para la detección de anticuerpos que inhiban la hemaglutinación (función de agregación de glóbulos rojos) [33].

Esta prueba ha sido ampliamente usada para medir la efectividad de vacunas contra el virus de Newcastle, pero se ha demostrado que el ensayo HI no puede detectar niveles bajos de anticuerpos circulantes. Lo que sugiere un cambio de método a uno más sensible para medir la respuesta de anticuerpos y así asegurar una debida protección contra el virus [11,12].

1.4.2 Ensayo de Neutralización

Los ensayos de neutralización (NT) están encargados de detectar anticuerpos que bloqueen a un determinante antigénico, por lo cual suelen estar relacionados con el nivel de protección biológica de la especie [11]. Estas pruebas de neutralización representan el máximo estándar al momento de medir la inmunidad específica del organismo frente a un agente extraño. Generalmente estas pruebas siguen dos pasos importantes para detectar anticuerpos neutralizantes, en el primero se utiliza el suero del animal para incubar al patógeno y en el segundo se inocula el patógeno en un sustrato susceptible a la infección.

Este ensayo detecta anticuerpos neutralizantes (nAbs) que inhiben la infección, es decir, en el caso de NDV, detectan los anticuerpos contra las proteínas hemaglutinina-neuroaminidasa (HN) y la proteína de fusión (F) que son las encargadas del proceso de infección. Las pruebas convencionales implican la formación y conteo de placas ya sea por tinción bioquímica o inmunotinción [11], lo que resulta en un ensayo laborioso y que puede tomar de tres a cinco días.

1.5 Genética inversa y sistema de rescate

Con el objetivo de desarrollar una herramienta biológica capaz de acelerar el ensayo de neutralización, se utiliza la genética inversa para generar virus recombinantes a partir del ARN genómico viral. Esta tecnología permite la manipulación del material genético de ARN viral, transformándolo en ADN y luego de regreso a ARN.

CAPÍTULO # 2

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente proyecto se desarrolla bajo las directrices del Laboratorio para Investigaciones Biomédicas de la ESPOL.

En este proyecto, se establecen dos modelos de NDV recombinante, uno que exprese la proteína verde fluorescente mejorada (eGFP) y otro que exprese la proteína Nano Luciferasa (NanoLuc). Estos virus recombinantes se utilizan como herramientas para el desarrollo de un ensayo de neutralización, en la que se puede cuantificar directamente los anticuerpos neutralizantes (nAbs) en las muestras de sueros de animales vacunados.

Con el fin de garantizar la protección y manejo adecuado de las muestras de virus, esta investigación se debe realizar bajo nivel de bioseguridad 2. Es decir, en un laboratorio con separación de áreas y que cuente con una cámara de flujo laminar clase II y tipo A, además de las buenas prácticas de bioseguridad de un laboratorio que trabaje con agentes infecciosos que no representen un peligro para el ser humano.

2.1 Virus NDV, cepa «La Sota».

Para la preparación del virus recombinante, se trabajará con la cepa «La Sota» del virus de Newcastle. Este tipo de cepa es por lo general utilizada en la fabricación de la vacuna contra el NDV en Ecuador. Se la empleará para la amplificación de cada uno de los genes del genoma.

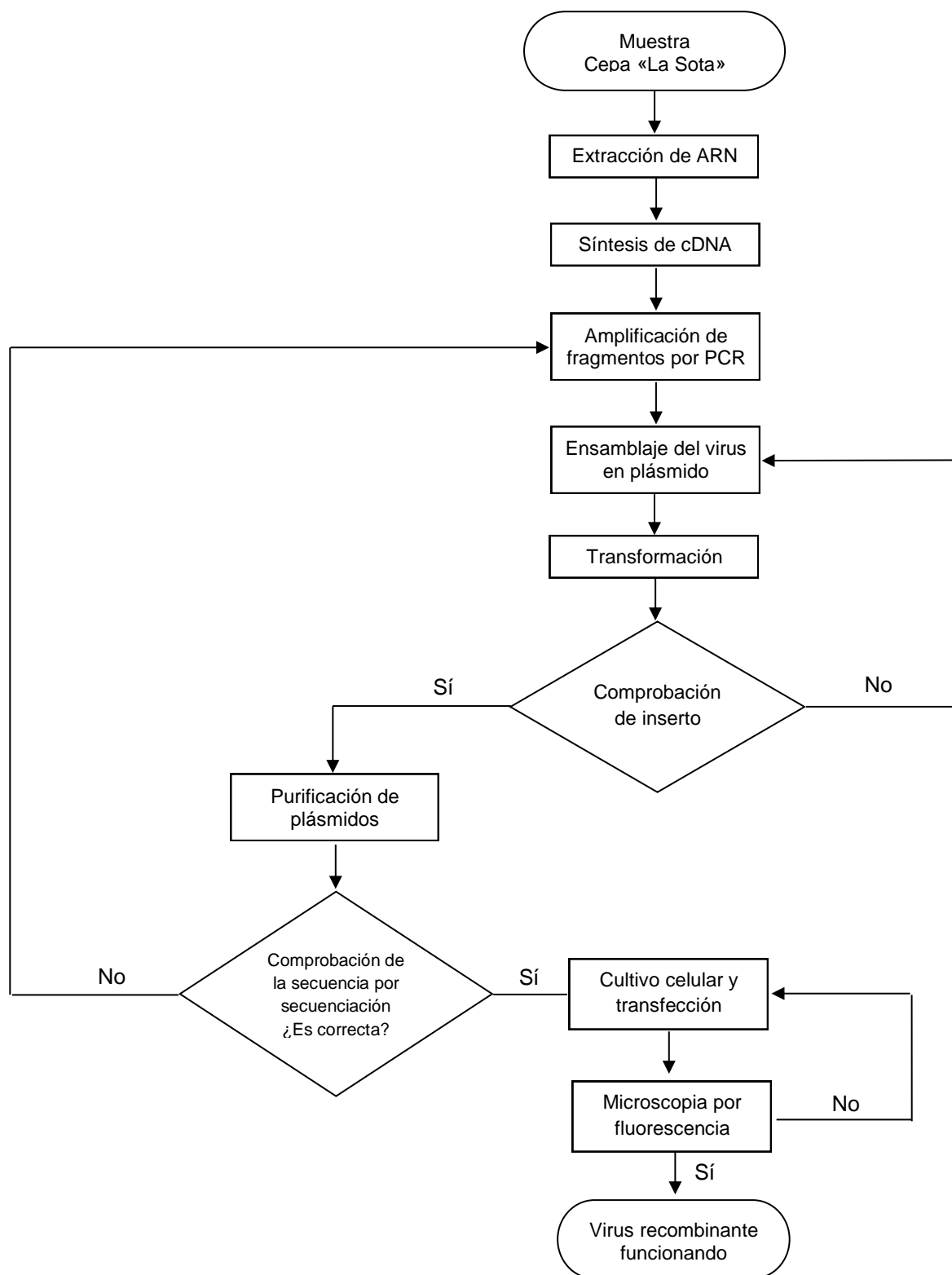


Figura 4. Diagrama de Flujo de la Construcción del virus recombinante

2.2 Gen Reportero

Los genes reporteros son ciertos tipos de genes que al ser transcritos reportan algún tipo de actividad deseada. Por lo general, estos genes son exógenos y no son parte del genoma de la especie en estudio. Por lo tanto, su actividad no se puede confundir con los transcritos de la especie en estudio. Los genes reporteros más usados en la biología de células de mamíferos con los de fluorescencia verde mejorada (eGFP) y el de luciferasa (Luc). Estos genes se clonan bajo en comando de la región promotora del gen natural en estudio.

2.2.1 Enhanced Green Fluorescent Protein

La proteína verde fluorescente (eGFP), es una proteína de 714 pares de bases (pb) con 238 aminoácidos y 28 kDa, es una variante de la GFP convencional y es utilizada como marcador celular; esta proteína sirve para detectar procesos dinámicos de crecimiento y morfogénesis directamente en el tejido vivo mediante fluorescencia [34]. El origen de esta proteína en la naturaleza, es la medusa bioluminiscente *Aequorea victoria*; esta fluorescencia estable resultante es producto de la unión de calcio con la fotoproteína aequorina [34].

La eGFP es capaz de absorber la luz azul (entre un rango de 395 nm a 470 nm) y emitir luz verde (de 509 nm). En células procariontas (como *Escherichia coli*) o eucariotas (como *Caenorhabditis elegans*), produce un producto fluorescente como "gusanos luminosos", donde las células vivas se vuelven brillantes y establemente fluorescentes. Este método puede aplicarse en bacterias, levaduras y *Drosophila*; y se usa para controlar la expresión génica y la localización de proteínas en organismos vivos.

2.2.2 Nano Luciferasa

La molécula de Nano luciferasa (Nano Luc) es una proteína luminiscente desarrollada por Promega; que codifica un gen corto de 516 pb con 171 aminoácidos, donde su pequeño tamaño es beneficioso para determinados procesos como clonación. Nano Luc es una enzima monomérica independiente de ATP, estable de 19.1 kDa; utiliza un sustrato llamado furimazina, que produce luminiscencia en células de mamíferos y es alrededor de 150 veces más luminiscente que otras luciferasas conocidas (1×10^9 RLU - Unidad de luz relativa) [35].

Esta enzima, proveniente del camarón de aguas profundas *Oplophorus gracilirostris*, es el resultado del acoplamiento entre la luciferasa y su análogo furimazina [36]. Dicha macromolécula fue modificada con el objetivo de brindar una estructura enzimática más estable, capaz de servir como un reportero eficiente en el análisis celular [36].

2.3 Plásmidos

Para la construcción del vector de transcripción en el sistema de rescate se usará el plásmido de expresión llamado pCAGGs [37] el cual contiene una secuencia que recluta la Polimerasa II. Este plásmido también será usado como un vector de transporte en la construcción de plásmidos auxiliares que contengan las proteínas principales que conforman el complejo ribonucleoproteico (Nucleoproteína, Fosfoproteína y Polimerasa). Este vector es usado por su bajo número de copias, de manera que se evita un mayor número de errores en el proceso de clonación.

2.4 Extracción de ARN

La extracción del ácido ribonucleico es el primer paso a seguir para este estudio molecular, donde de una muestra de sangre de pollo infectado se aísla el ARN viral del NDV, cepa «La Sota» del resto de componentes celulares presentes en la muestra.

La muestra se extrae con su respectivo control de extracción, siguiendo protocolos específicos; para asegurar que, durante el proceso no existió ningún tipo de contaminación [38]. Se almacena las muestras en un congelador a -80°C para garantizar la óptima preservación de las mismas.

2.5 Síntesis de ADN complementario

Para la generación del ADNc se debe utilizar como molde el ARN viral previamente extraído, este proceso deberá realizarse empleando enzimas de alta fidelidad que garanticen la confiabilidad del mismo.

2.6 Análisis de restricción

Con la finalidad de conocer que enzimas utilizar para poder cortar el genoma en fragmentos, se debe realizar un análisis de restricción de la secuencia de NDV de la cepa «La Sota», esto permitirá conocer de mejor manera si se deben agregar nuevos sitios de restricción por mutagénesis.

Para la realización de este proyecto se determinó agregar sitios Sapl para cortar el genoma completo (Fig. 5).

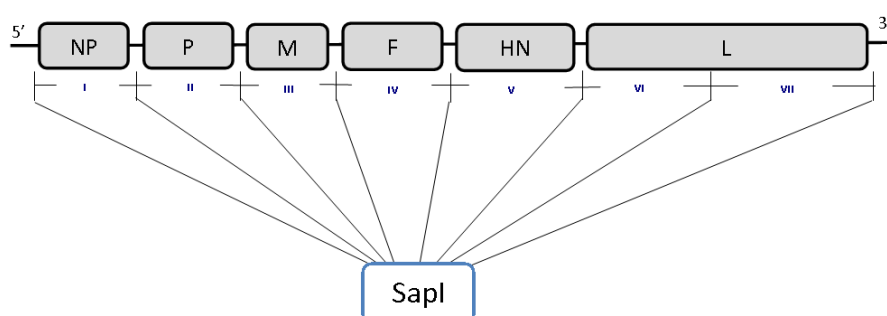


Figura 5. Sitios de restricción Sapl en el genoma del virus de Newcastle

2.7 Amplificación por PCR

Para generar fragmentos adecuados a partir del genoma completo del virus en ADNc, se diseñan sitios de restricción Sapl y cebadores específicos de los resultados obtenidos del análisis de restricción, estos cebadores son utilizados para la síntesis de ADNc; los cuales amplificarán fragmentos del genoma viral deseados de aproximadamente 2000 o más nucleótidos de longitud. Estos 7 fragmentos finales resultantes serán luego ensamblados e incorporados en un plásmido.

2.8 Clonación molecular

El proceso de la clonación molecular consiste en seleccionar un fragmento de ADN y producir miles de copias del mismo. Este tiene cuatro pasos principales:

- **Digestión:** Ocurre la fragmentación del ADN de interés; el número de fragmentos dependerá del tamaño del genoma.
- **Ligación:** El fragmento se inserta en un vector de clonación (plásmido), utilizando enzimas de restricción, e incubándola con una enzima llamada ADN ligasa.
- **Transformación:** Transferencia de la secuencia de interés dentro la célula de un microorganismo, en este caso de una Bacteria *E. Coli*. DH5 α . En donde se aprovecha de la facilidad de replicación del plásmido, para replicar el segmento de ADN transferido o también llamado inserto.
- **Selección:** Se seleccionan las células transformadas con éxito, por su coloración y luego por comprobación por PCR.

2.8.1 Ensamblaje en plásmido

Los productos purificados de la amplificación por PCR de cada uno de los 7 fragmentos serán sujetos a las digestiones respectivas, usando la enzima de restricción Sapl que reconozca y corte en lugares específicos para que puedan ser insertados en el plásmido de transporte. Este proceso de cortar el ADN por enzimas de restricción es clave para la generación de ADN recombinante.

El producto resultante de la digestión será insertado en el plásmido de transporte pCAGGs utilizando la enzima ligasa T4 para unir covalentemente las dos cadenas de ADN siguiendo los protocolos estándar. Una vez ligado cada uno de los fragmentos en los plásmidos de transporte, estos serán extraídos e insertados en un vector de expresión pCAGGs que contiene el promotor Pol II, además estarán flanqueados por el HamRz y HdvRz, para permitir que el promotor inicie la replicación viral [23].

2.8.2 Transformación

Una vez obtenido el producto ligado, se someterán a los plásmidos a un proceso llamado transformación, en donde por alteración genética de células competentes eficientes como las DH5 α [39], se incorpora material genético ajeno como los plásmidos dentro de bacterias *Escherichia coli*, con el fin de generar altas cantidades de copias de la concentración del producto plasmídico.

2.8.3 Comprobación de inserto y purificación de plásmido

Una vez que la concentración del material genético plasmídico haya aumentado, se selecciona entre todas las colonias de bacterias sembradas durante la transformación las bacterias con coloración blanca y se comprueba la presencia del inserto por PCR. Se determina de esta manera las colonias con el inserto y se las cultiva en medio LB durante toda la noche, para luego realizar una purificación de plásmido y así extraer ADN plasmídico puro.

2.9 Secuenciación

Con el fin de confirmar la presencia del gen reportero y la correcta construcción y secuencia del virus recombinante, se analizará el correcto orden del genoma viral del plásmido de expresión principal pCAGGs tomando en cuenta la regla del 6. Posteriormente, Serán recibidas las secuencias en forma digital para poder ser analizadas en el software Geneious para su debido análisis bioinformático.

2.10 Cultivo celular y Transfección en células

Las células de riñón de hámster bebé, en inglés baby hamster kidney (BHK) cells; se cultivarán en medio de crecimiento por un periodo de incubación máximo de 24 horas a 37 °C, siguiendo el protocolo específico de la línea celular. Una vez obtenido el cultivo se procede a la transfección del virus, junto con las tres proteínas principales en células BHK-21 usando placas de cultivo tisular y después de 72 horas se determina por titulación del sobrenadante la cantidad de células infectadas [40].

Como medida final para el rescate y comprobación del funcionamiento de este virus recombinante, se visualiza el crecimiento del virus en las células por medio de microscopia de fluorescencia para eGFP y usando un lector de Elisa para la medición de luminiscencia del NanoLuc.

2.11 Cuantificación o titulación

La titulación es el proceso donde se determina la concentración de virus en una preparación (Fig. 6); el NDV se puede medir de varias maneras, pero entre los más utilizados está el ensayo de placas. A partir de esta prueba se puede realizar los métodos de evaluación de vacunas.

2.11.1 Ensayo de placas

Para este método se debe preparar diluciones 10 veces tanto del virus recombinante como del virus silvestre e incubarlas en monocapas de células susceptibles (como BHK-21). El virus infectara células generando zonas circulares denominadas placas, que indican la lisis celular por motivo de la infección. Mediante este ensayo se logra determinar la infectividad del stock (el número de partículas de virus infecciosas) en unidades formadoras de placa (pfu) / ml.

Información que servirá para llegar a una concentración estándar para realizar el ensayo de neutralización viral [41].

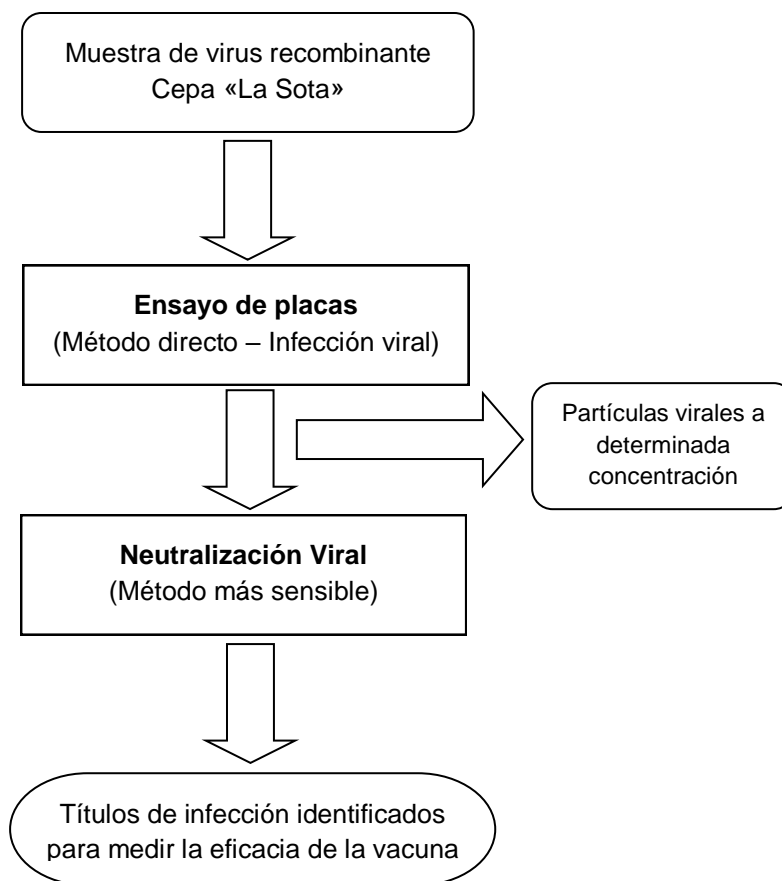


Figura 6. Esquema de ensayos para la cuantificación e inhibición de partículas virales

2.12 Medición de la respuesta serológica a las vacunas

El siguiente método empleado es un ensayo de neutralización que evalúa de manera específica las vacunas contra la enfermedad de Newcastle.

2.12.1 Inhibición de la multiplicación viral o Neutralización

El ensayo de neutralización o neutralización vírica se utiliza para medir los niveles de inmunidad protectora frente a un patógeno, mediante la detección de anticuerpos

capaces de bloquear los epítomos críticos del patógeno; en el caso del NDV bloquea a las proteínas del gen HN y F encargadas de la replicación viral [11].

Para esta prueba primero se realiza la incubación del patógeno recombinante con las diferentes diluciones del suero del animal a analizar, luego se inocula al patógeno en un cultivo celular. Si el suero posee anticuerpos, la capacidad infectiva del patógeno se bloquea y, por lo tanto, no produce la infección del cultivo. Este ensayo se realiza en una placa de cultivo celular, en donde los resultados se pueden visualizar por microscopia de fluorescencia o por un Lector de Elisa dependiendo del virus recombinante utilizado, en el lector Elisa se puede obtener resultados con cualquiera de los dos virus diseñados ya que mide tanto fluorescencia como luminiscencia.

Por lo general se evita este método, porque toma demasiado tiempo, pero mediante la incorporación de genes reporteros fluorescentes/luminiscentes en el genoma viral, se facilita su visualización, reduciendo considerablemente el tiempo de análisis a 24 horas.

CAPÍTULO # 3

RESULTADOS

3.1 Resultados

3.1.1 Modelo de virus recombinante

Para la construcción de un virus genéticamente modificado, se realiza mutagénesis y técnicas moleculares de genética inversa al genoma original del virus de Newcastle, con el fin de insertar los genes exógenos de fluorescencia (eGFP) o luminiscencia (Nano luciferasa) entre los genes de fosfoproteína (P) y la matriz (M). Así mismo estará insertada la secuencia Kozak al inicio del gen exógeno para que sirva como estabilizador de la cadena (Fig. 7). Este plásmido estará construido de tal manera que se respete la regla de seis indispensable para la replicación viral.

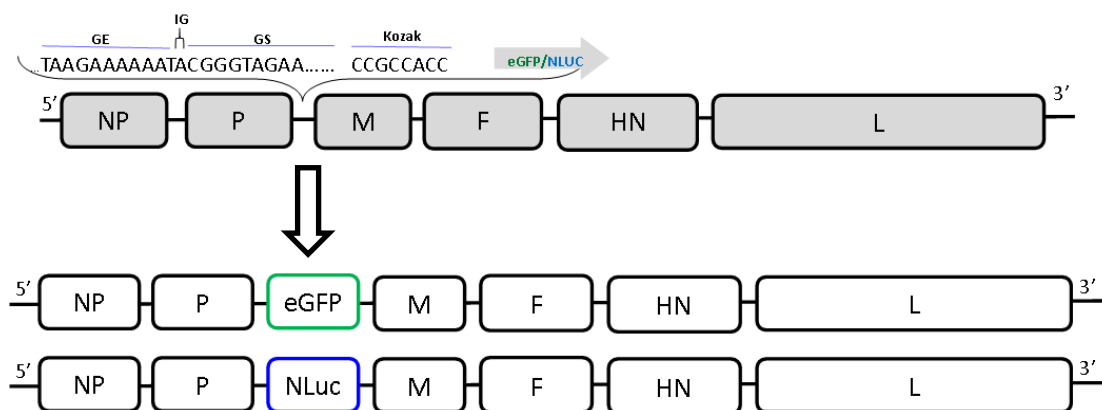


Figura 7. Inserción de los genes reporteros

Luego el genoma recombinante resultante se inserta en un vector de expresión pCAGGsGFP o pCAGGsNluc (Anexo 1 y 2). Estos plásmidos usarán como promotor y terminador para el sistema de replicación viral al ARN Polimerasa II.

Con la ayuda de plásmidos auxiliares de las tres proteínas esenciales (NP, P y L) para la replicación viral (Anexo 3), en conjunto con los plásmidos de expresión pCAGGsGFP o pCAGGsNluc que contiene la cadena completa del virus modificado se consigue transfectar las células BHK-21 y lograr el rescate del virus.

Para un rescate mucho más eficiente estará incorporado en los extremos de los plásmidos, la ribozima cabeza de martillo o Hammerhead (HamRz) y la ribozima del virus de la hepatitis delta (HdvRz).

Cada virus recombinante elaborado, será debidamente verificado por secuenciación. Al tener insertado una secuencia de gen reportero con características fluorescentes como eGFP y luminiscentes como Nano Luc, se espera que este plásmido se visualice fácilmente por microscopia de fluorescencia o por un lector de ELISA respectivamente.

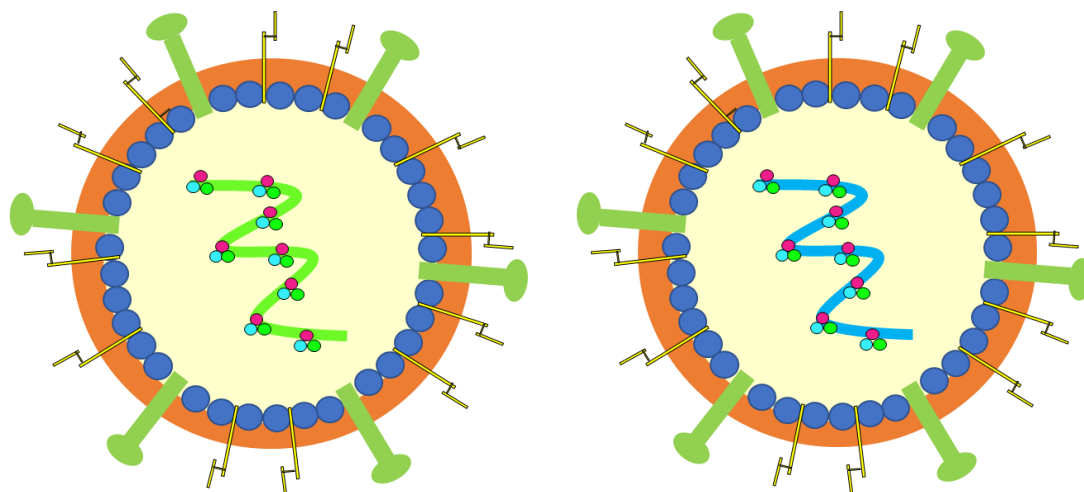


Figura 8. Modelos de virus recombinante fluorescente eGFP de color verde (Izquierda) o luminiscente Nanoluc de color azul (derecha)

A los 3 días de la transfección se podrá recuperar el virus con una titulación alta de PFU/ml (Fig. 8), estos altos niveles servirán como base para las pruebas serológicas de evaluación de vacunas.

3.1.2 Ensayo de Neutralización con virus recombinante

Se implementa el virus recombinante fluorescente o luminiscente al ensayo de neutralización, con el fin de acelerar la obtención de resultados. Al extraer el suero de un pollo vacunado y colocarlo a diferentes diluciones junto con el virus recombinante a una concentración estándar. Se espera que el suero tenga los suficientes anticuerpos como para bloquear la entrada del virus a las células BHK-21.

La visualización de resultados por fluorescencia o luminiscencia se obtendrá en aproximadamente 18 horas, siendo mucho más claras las células a las 24 horas de incubación; siendo una gran reducción considerando que el ensayo de neutralización convencional muestra resultados en 5-6 días [11].

Si una vacuna es eficiente debería otorgar los anticuerpos necesarios como para bloquear el virus recombinante, por lo que se puede realizar muchas diluciones y las células infectadas serán relativamente pocas (Fig. 9).

Vacuna eficiente= Animal protegido

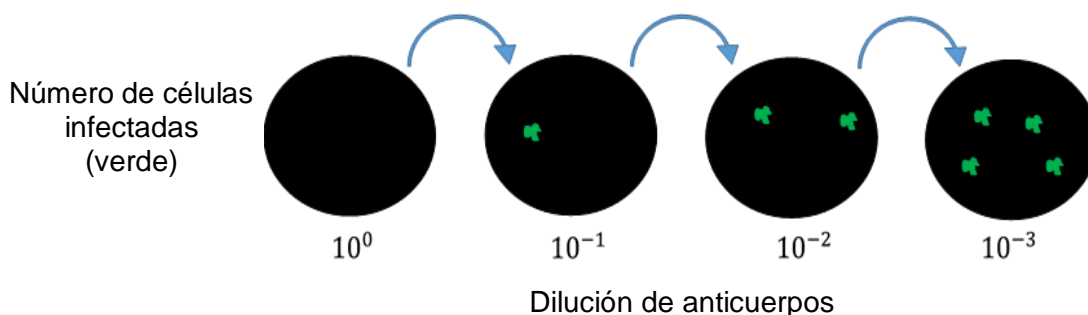


Figura 9. Representación gráfica del ensayo de neutralización en una vacuna eficiente.

En cambio, si una vacuna es deficiente basta con solo unas cuantas diluciones para que se visualice células infectadas, por lo que el animal no tiene suficientes anticuerpos como para combatir la infección (Fig. 10).

Vacuna deficiente = Animal poco protegido

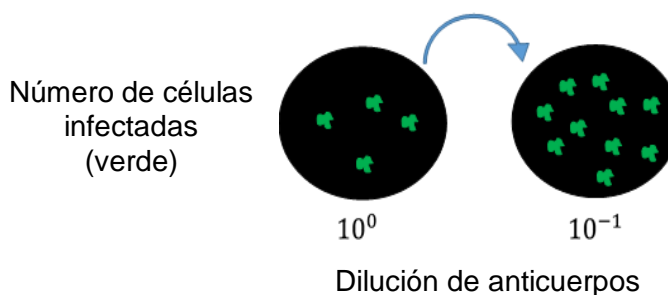


Figura 10. Representación gráfica del ensayo de neutralización en una vacuna eficiente.

Se espera que el uso del virus recombinante en el ensayo de neutralización facilite la identificación de las células infectadas por medio de fluorescencia/ luminiscencia; en comparación con el ensayo de inhibición de hemaglutinación que solo identifica anticuerpos, y no la infección como tal, siendo un método poco específico para la identificación de presencia del virus.

3.2 Discusión

Existen diversos tipos de pruebas serológicas empleadas para validar la efectividad de una vacuna. Muchas de ellas son capaces de detectar anticuerpos generales o neutralizantes que se encuentren en el suero del animal vacunado. La inhibición de hemaglutinación (HI) es una prueba comúnmente aplicada para la evaluación de las vacunas contra NDV, este ensayo determina la presencia de anticuerpos contra este virus. Sin embargo, existen pruebas que determinan la presencia de anticuerpos que inhiben la infección viral ofreciendo una evaluación real del nivel de protección de la vacunación.

La prueba HI expresa la cantidad de anticuerpos contra las proteínas del gen viral HN [42], que interfieren en la hemaglutinación. Por otro lado, la cantidad de anticuerpos neutralizantes contra las proteínas virales HN y F [11], que inhiben la infección en un sustrato celular, *in vitro*, determinan la protección real que genera un protocolo de vacunación. La herramienta biológica propuesta permite la directa visualización y cuantificación de dichos anticuerpos presentes en el suero de aves vacunadas. El método es cuantitativo y de alta salida si se utiliza un lector de placas.

Es por eso, que la importancia del monitoreo serológico radica en crear una línea base que permita dar seguimiento constante a las vacunas usadas en la avicultura, creando de esta manera una herramienta relevante para la implementación de nuevas estrategias que posibiliten controlar las enfermedades que perjudican a la industria avícola [42].

El estudio de la importancia de los anticuerpos neutralizantes en la protección y contra la dispersión del virus ha sido bien documentado en diferentes estudios [38,39]. Por lo tanto, se ha creado una necesidad de evaluar este tipo de anticuerpos en las vacunas contra el NDV.

Tomando como referencia los resultados del 2017, por Chumbe y colaboradores [11], se puede aseverar que existe diferencias entre los métodos de evaluación comunes como la prueba de HI y el de neutralización para medir la eficacia de vacunas.

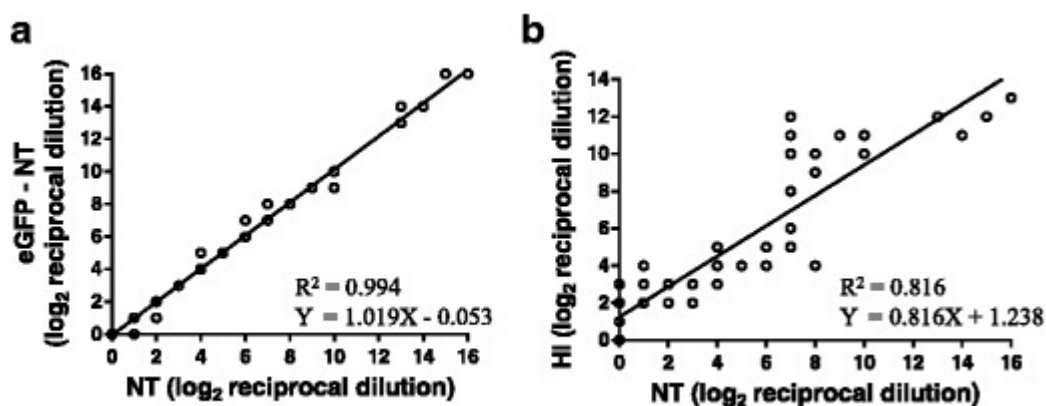


Figura 11. Comparación de ensayo de neutralización (NT) convencional con eGFP-NT y HI de 57 muestras de suero de pollo. Imagen original de A. Chumbe et al., [11].

En la figura 11 (a) proveniente del estudio antes mencionado, se muestra una correlación entre los ensayos de Neutralización convencional y los ensayos con un gen externo eGFP-NT (no convencional) [11]. Los datos demuestran una fuerte correlación entre estos dos ensayos indicando la confiabilidad para el uso del eGFP-NT. En cambio, en la figura 11 (b) se evidencia que durante la comparación de NT y el ensayo de inhibición de la hemaglutinación existe una mayor dispersión, volviéndolo menos confiable. Así mismo otros estudios publicados, han demostrado la sensibilidad que tiene el ensayo de neutralización frente a otras pruebas serológicas, dado que la prueba de inhibición de hemaglutinación no es capaz de detectar anticuerpos circulantes cuando estos se encuentran presentes en niveles muy bajos [43].

La técnica de neutralización usando genes reporteros exógenos, ofrece una rápida y precisa medición de anticuerpos neutralizantes contra la enfermedad ND. Se puede tener una visión más específica y sensible del nivel de protección que proporcionan las vacunas comerciales, así mismo representa una base para futuras investigaciones y desarrollo de nuevas vacunas.

CONCLUSIONES

El presente proyecto muestra un método sensible, específico, rápido y cuantitativo para evaluar la efectividad de las vacunas comerciales contra la enfermedad de Newcastle. Este método utiliza un virus recombinante de NDV, el cual expresa un gen reportero que permite detectar visualmente o electrónicamente la inhibición de infección, *in vitro*, por anticuerpos neutralizantes presentes en el suero de aves vacunadas. La utilización de un lector de placas, permite que el ensayo sea cuantitativo y a gran escala. Este método permitirá que los productores avícolas puedan realizar una evaluación efectiva de sus protocolos de vacunación.

La tecnología implementada podrá aplicarse al desarrollo de vacunas de NDV con genes de F y HN de cepas locales. Además, se podrá introducir genes adicionales para crear vacunas bivalentes.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro, "Programa Nacional Sanitario Avícola," p. 112, 2013.
- [2] Organización Mundial de Sanidad Animal, "Enfermedades de la Lista de la OIE 2017: OIE - World Organisation for Animal Health," 2017. [Online]. Available: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/oie-listed-diseases-2017/>. [Accessed: 22-Nov-2017].
- [3] AGROCALIDAD, "Guía Para La Prevención Y Control De Influenza Aviar Y La Enfermedad De Newcastle," 2013.
- [4] D. J. Alexander, "Newcastle disease," *Br. Poult. Sci.*, vol. 42, no. 1, pp. 5–22, 2001.
- [5] J. E. Armijos Montaña, A. Luzuriaga Neira, F. Cueva Castillo, G. Escudero Sánchez, L. Zamora Gutierrez, and G. Villacís Rivas, "DETECCIÓN DEL VIRUS DE NEWCASTLE EN GALLINAS CRIOLLAS EN LA PROVINCIA DE LOJA," *Cent. Biotecnol.*, vol. 4, no. 1, pp. 61–65, 2015.
- [6] B. Seal, D. King, and H. Sellers, "The avian response to Newcastle disease virus," *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 24, no. 2–3, pp. 257–268, 2000.
- [7] B. Peeters, O. de Leeuw, G. Koch, and A. Gielkens, "Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence.,," *J. Virol.*, vol. 73, no. 6, pp. 5001–9, 1999.
- [8] S. Cuello, A. Vega, and J. Noda, "Actualización sobre la enfermedad de Newcastle," *Rev. Electron. Vet.*, vol. 12, no. 6, pp. 1–30, 2011.
- [9] OIE, "¿Qué es la enfermedad de Newcastle? ¿Dónde existe la enfermedad?," *Fichas Inf. Gen. sobre enfermedades Anim.*, p. 6.
- [10] G. Villacís, G. Escudero, F. Cueva, and A. Luzuriaga, "Aislamiento del virus de la enfermedad de Newcastle en zonas rurales del sur del Ecuador," *Rev.*

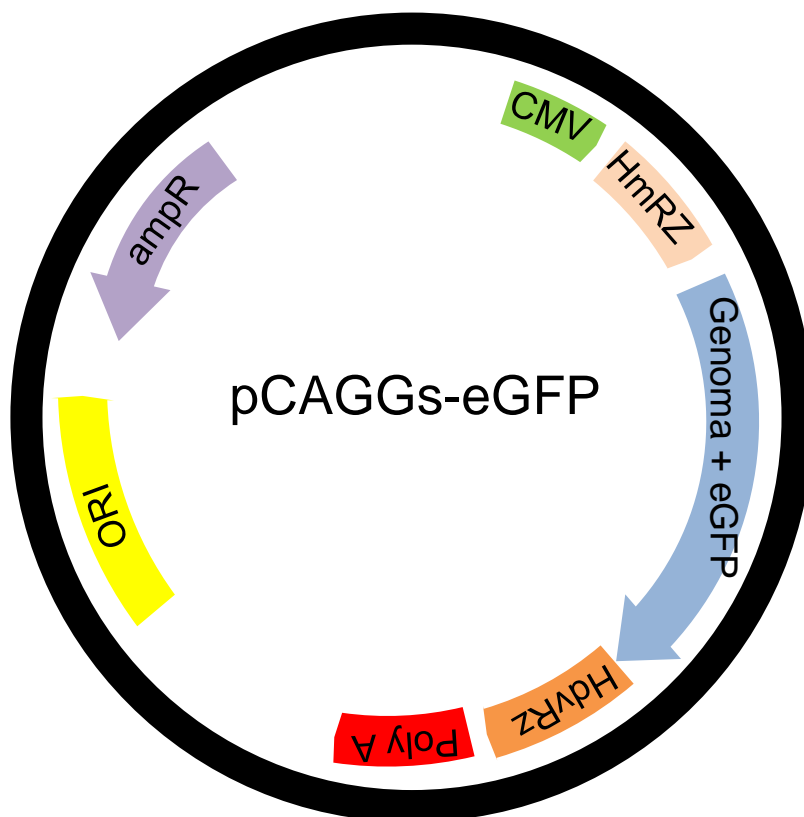
- CEDAMAZ*, vol. 4, no. 1, pp. 86–90, 2014.
- [11] A. Chumbe, R. Izquierdo-Lara, K. Calderón, M. Fernández-Díaz, and V. N. Vakharia, “Development of a novel Newcastle disease virus (NDV) neutralization test based on recombinant NDV expressing enhanced green fluorescent protein,” *Virologica J.*, vol. 14, no. 1, p. 232, 2017.
- [12] B. P. Peeters, O. S. de Leeuw, G. Koch, and A. L. Gielkens, “Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence.,” *J. Virol.*, vol. 73, no. 6, pp. 5001–9, 1999.
- [13] A. y P. del E. Ministerio de Agricultura, Ganadería, “Sistema Nacional de Información Pública Agropecuaria,” 2016. [Online]. Available: <http://sinagap.agricultura.gob.ec/>. [Accessed: 12-Nov-2017].
- [14] INEC, “Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua,” 2014.
- [15] El Telégrafo, “Ecuatorianos consumen 32 kg de pollo al año,” 27-Oct-2017.
- [16] M. Intriago, “Políticas de importación de Soya y su impacto en la Producción Avícola en la Provincia de Manabí,” Universidad De Guayaquil- Facultad De Ciencias Económicas, 2015.
- [17] J. Jaimes-Olaya, A. Gómez, M. Álvarez, D. Soler, J. Romero, and L. Villamil, “Las enfermedades infecciosas y su importancia en el sector avícola,” *Rev. Med. Vet. (Bogota)*, vol. N° 20, pp. 49–61, 2010.
- [18] F.-X. Briand, A. Henry, P. Massin, and V. Jestin, “Complete Genome Sequence of a Novel Avian Paramyxovirus,” *J. Virol.*, vol. 86, no. 14, pp. 7710–7710, 2012.
- [19] J. Wang *et al.*, “Genomic Characterizations of a Newcastle Disease Virus Isolated from Ducks in Live Bird Markets in China,” *PLoS One*, vol. 11, no. 7, pp. 1–9, 2016.
- [20] L. W. McGinnes, H. Pantua, J. Reitter, and T. G. Morrison, “Current Protocols in Microbiology,” no. SUPPL.19, 2010.
- [21] C. Valladares de la Cruz, “La enfermedad de newcastle. presentaciones

- clínicas, diagnóstico diferencial,” vol. 9, no. Cuadro 1, pp. 1–8, 2016.
- [22] R. Moreno, “La enfermedad de Newcastle y algunos avances recientes de diagnóstico,” *Cienc. Vet.*, pp. 49–72, 2010.
- [23] B. Li *et al.*, “Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA using an RNA polymerase II promoter,” *Arch. Virol.*, vol. 156, no. 6, pp. 979–986, 2011.
- [24] S. Xiao *et al.*, “Complete Genome Sequences of Newcastle Disease Virus Strains Circulating in Chicken Populations of Indonesia,” *J. Virol.*, vol. 86, no. 10, pp. 5969–5970, 2012.
- [25] M. Park, A. García-sastre, J. Cros, C. Basler, and P. Palese, “Newcastle Disease Virus V Protein Is a Determinant of Host Range Restriction Newcastle Disease Virus V Protein Is a Determinant of Host Range Restriction,” *J. Virol.*, vol. 77, no. 17, pp. 9522–9532, 2003.
- [26] J. Holguera, “Estudio de los mecanismos moleculares de entrada de los paramixovirus en la célula hospedadora: el RSV y el NDV.,” UNIVERSIDAD DE SALAMANCA, 2012.
- [27] J. Ayllón, “El virus de la enfermedad de Newcastle : Modelo de interacción virus-célula y vector de expresión,” 2009.
- [28] F. Velásquez and A. Gil, “Técnicas diagnósticas para la enfermedad de Newcastle en aves de producción,” 2016.
- [29] The Center for Food Security and Public Health, “Enfermedad de Newcastle,” *Código Sanit. para Anim. Terr.*, pp. 1–15, 2010.
- [30] World Organization for Animal Health (OIE), “Newcastle Disease (Infection with Newcastle Disease Virus),” *Man. diagnostic tests vaccines Terr. Anim. (mammals, birds bees)*, vol. 1, pp. 555–574, 2012.
- [31] “VACUNACIONES DE LAS AVES,” *Asoc. Española Cienc. Avícola*, p. 24, 2005.
- [32] Finkero, “Prevención y control de Newcastle,” 2016. [Online]. Available: <http://abc.finkeros.com/prevencion-y-control-de-newcastle/>.

- [33] J. M. Walker, *Animal Influenza Virus*, 2nd ed. Methods in Molecular Biology, 2014.
- [34] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. Ward, and D. Prasher, "Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression," *Science (80-.)*, vol. 263, no. Vol. 263, No. 5148, pp. 802–805, 1994.
- [35] N. Boute, P. Lowe, S. Berger, M. Malissard, A. Robert, and M. Tesar, "NanoLuc Luciferase - A multifunctional tool for high throughput antibody screening," *Front. Pharmacol.*, vol. 7, no. FEB, pp. 1–11, 2016.
- [36] M. Hall *et al.*, "Engineered Luciferase Reporter from a Deep Sea Shrimp Utilizing a Novel Imidazopyrazinone Substrate," 2012.
- [37] Addgene, "Plasmid: pCAGGS." [Online]. Available: <https://www.addgene.org/vector-database/2042/>. [Accessed: 10-Feb-2018].
- [38] Molecular Research Center, "TRI REAGENT ® -RNA / DNA / PROTEIN ISOLATION REAGENT," 2007.
- [39] I. Corporation and Invitrogen Corporation, "Subcloning Efficiency™ DH5a™ Competent Cells," *Transformation*, vol. 1, no. 18265, pp. 0–4, 2006.
- [40] P. J. Miller *et al.*, "Effects of Newcastle disease virus vaccine antibodies on the shedding and transmission of challenge viruses," *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 41, no. 4, pp. 505–513, 2013.
- [41] A. Baer and K. Kehn-Hall, "Viral Concentration Determination Through Plaque Assays: Using Traditional and Novel Overlay Systems," *J. Vis. Exp.*, no. 93, pp. 1–10, 2014.
- [42] C. Cajacuri, "Concordancia entre las pruebas de inhibición de la hemoaglutinación (hi) y Elisa , en la detección de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Newcastle en pollos de engorde," pp. 1–65, 2014.
- [43] D. L. Reynolds and A. D. Maraq, "Protective immunity against Newcastle disease: the role of antibodies specific to Newcastle disease virus polypeptides," *Avian Dis.*, vol. 44, no. 1, pp. 138–144, 1999.

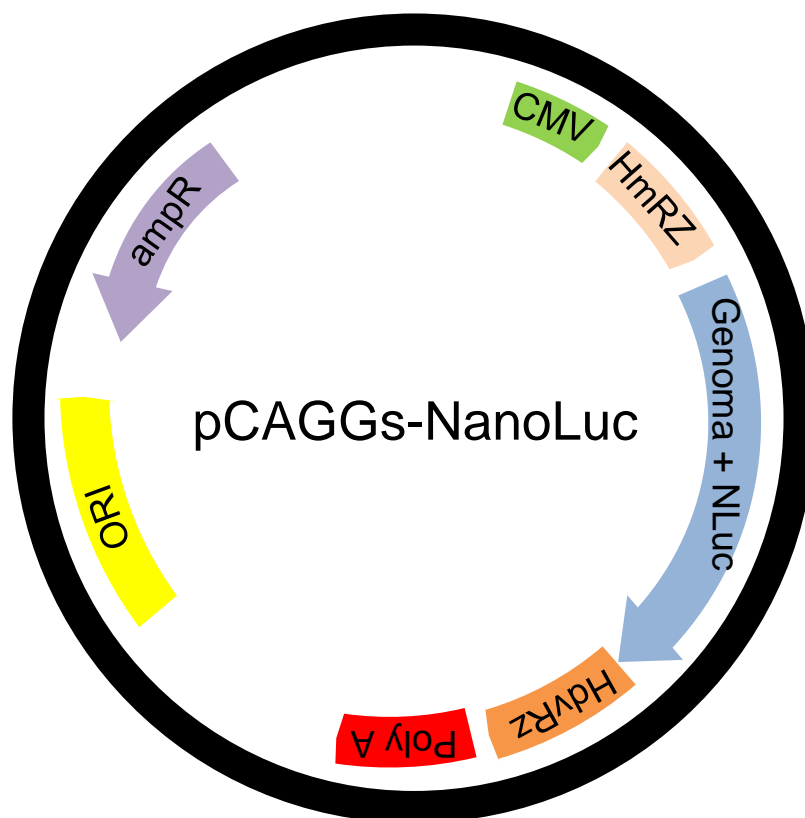
ANEXOS

Anexo 1. Plásmido de expresión con Proteína Verde Fluorescente



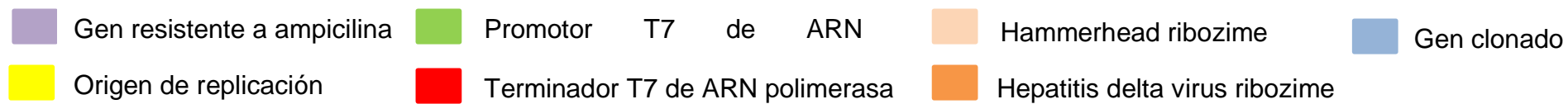
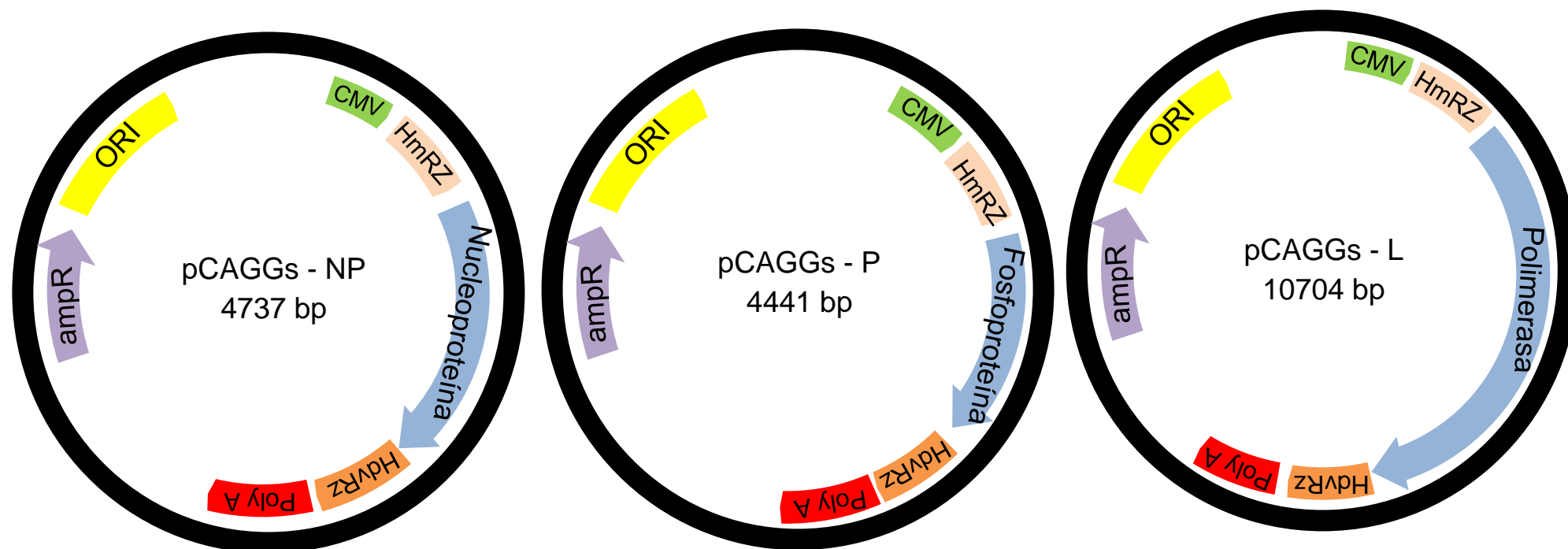
- Gen resistente a ampicilina
- Origen de replicación
- Promotor Citomegalo virus- 40 de ARN polimerasa
- Hammerhead ribozime
- Genoma de NDV con gen Reportero Fluorescente - eGFP
- Hepatitis delta virus ribozime
- Terminador Poly A

Anexo 2. Plásmido de expresión con Nano Luciferasa



- Gen resistente a ampicilina
- Origen de replicación
- Promotor Citomegalo virus- 40 de ARN polimerasa
- Hammerhead ribozime
- Genoma de NDV con gen Reportero Luminiscente - NanoLuc
- Hepatitis delta virus ribozime
- Terminador Poly A

Anexo 3. Plásmidos auxiliares



Anexo 4. Protocolo de Ensayo de Neutralización

Reactivos y materiales

Materiales	Descripción
Muestra de suero de pollo vacunado	Diferentes diluciones
Virus recombinante	Fluorescente/ Luminiscente, a una concentración constante
Células BHK-21	Baby hamster kidney (BHK-21) cells
DMEM F12	Medio Dulbecco MEM
SBF al 5% - 1%	Suero Bovino Fetal (SBF)
FA 5%	Fosfatasa Alcalina
DPBS	Estéril
Sustrato de ensayo de luciferasa Nano-Glo™ Buffer de ensayo de luciferasa Nano-Glo™	Reactivos para el Nano luciferasa
PBS	Phosphate Buffered Saline (Buffer fosfato salino)
BSA al 0,1%	Bovine Serum Albumin (albúmina de suero bovino)
Pipetas y Puntas de Microlitro	Pipetas de 1 - 10 ml; 20 ml; 100 ml estériles
Pipetas desechables	Estériles, envueltas individualmente Pipetas de 1 - 10 ml; 20 ml y de 100 ml
Placas de cultivo de fondo plano y negro	Placas de cultivo de poliestireno no pirogénico de 96 pocillos, estéril

Instrumentación

Materiales	Descripción
Gabinete de Seguridad Biológica	Estéril
Incubadora	Humidificada a 37 ° C, 5% CO2 de requisitos estándar
Microscopio de fluorescencia	Para visualizar la fluorescencia
Lector de ELISA	Lector de microplacas, mide luminiscencia
Congelador de baja temperatura	-70 °C o menos, -20 °C y 4 °C

Muestras de suero

Se usa muestras de suero obtenidas de pollos vacunados en el campo para NDV. Así mismo, se toma muestra de otros sueros de pollo correspondientes a otros tipos de virus como control negativo. Todas las muestras de suero se inactivan por calor (56 ° C durante 30 min) y se almacenan a -20 °C.

Metodología

Ensayo de neutralización (NT)

- Un día antes del ensayo, se sembraron 1×10^4 células BHK-21 por pocillo en 0,1 ml de DMEM F12 suplementado con FBS al 5%.
- Las muestras de suero se titularon por duplicado, usando placas de cultivo de poliestireno no pirogénico de fondo plano de 96 pocillos.
- El suero se diluye en serie, 2 veces (comenzando desde 1: 2) con medio libre de suero DMEM F12, complementado con FA y FBS a concentraciones finales de 5% y 1%, respectivamente.
- Las diluciones de suero se mezclaron con 100 UFP de virus (recombinante eGFP y recombinante Nanoluc); cada dilución se evaluó por duplicado.
- Una vez que las células BHK-21 se infectaron con mezclas de suero de virus.
- Se recomienda incubar las células durante 48 horas a 37 °C en CO₂ al 5%, luego las células se lavaron con DPBS.
- La fluorescencia del eGFP es visible desde las 18 horas de incubación y es claramente visible a las 24 horas por microscopía de fluorescencia.
- En el caso del virus recombinante de NanoLuc, luego de la incubación y lavado se necesita llegar a una concentración final de 10 pmol /l; se lo coloca en 50% de Buffer lisis de luciferasa Nano-Glo® con 50 µl de sustrato de luciferasa Nano-Glo® (furimazina) (en una dilución de 1/400 en PBS-BSA al 0,1%) [35].

- Se lee la luminiscencia (0,1 s / pocillo, sin filtro) en un lector de ELISA a temperatura ambiente; teniendo una vida media prolongada de 100 minutos.
- Se determina los títulos de neutralizantes (nB) de NDV mediante la falta de expresión de los genes exógenos. Los pocillos con uno o más focos fluorescentes/luminiscentes se consideraron positivos de células infectadas con el virus [11].