



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

**Desarrollo de un protocolo de detección de células de  
pollo (línea celular DF-1) infectadas por el Herpes  
Virus de Pavo (HVT) mediante citometría de flujo**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Bióloga Genetista  
Biotecnóloga

**AUTOR**

Astrid Gloria POMA ACEVEDO

**ASESOR**

Dra. Martha Esther VALDIVIA CUYA

Lima, Perú

2022



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Poma, A. (2022). *Desarrollo de un protocolo de detección de células de pollo (línea celular DF-1) infectadas por el Herpes Virus de Pavo (HVT) mediante citometría de flujo*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Genética y Biotecnología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

---

### Metadatos complementarios

|                                  |                                                                                           |
|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Datos de autor</b>            |                                                                                           |
| Nombres y apellidos              | Astrid Gloria Poma Acevedo                                                                |
| Tipo de documento de identidad   | DNI                                                                                       |
| Número de documento de identidad | 70297241                                                                                  |
| URL de ORCID                     | <a href="https://orcid.org/0000-0002-9814-3821">https://orcid.org/0000-0002-9814-3821</a> |
| <b>Datos de asesor</b>           |                                                                                           |
| Nombres y apellidos              | MSc. Martha Valdivia Cuya                                                                 |
| Tipo de documento de identidad   | DNI                                                                                       |
| Número de documento de identidad | 06449624                                                                                  |
| URL de ORCID                     | <a href="https://orcid.org/0000-0002-8301-5536">https://orcid.org/0000-0002-8301-5536</a> |
| <b>Datos del jurado</b>          |                                                                                           |
| <b>Presidente del jurado</b>     |                                                                                           |
| Nombres y apellidos              | Claudia Fiorella Barletta Carrillo                                                        |
| Tipo de documento                | DNI                                                                                       |
| Número de documento de identidad | 40846770                                                                                  |
| <b>Miembro del jurado 1</b>      |                                                                                           |
| Nombres y apellidos              | Patricia Gloria Woll Toso                                                                 |
| Tipo de documento                | DNI                                                                                       |
| Número de documento de identidad | 10587728                                                                                  |
| <b>Miembro del jurado 2</b>      |                                                                                           |
| Nombres y apellidos              | Nadia Felicita Vera Munarriz                                                              |
| Tipo de documento                | DNI                                                                                       |
| Número de documento de identidad | 00517731                                                                                  |
| <b>Datos de investigación</b>    |                                                                                           |
| Línea de investigación           | A.1.3.2. Sanidad Agropecuaria                                                             |

|                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|--------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Grupo de investigación                                 | En Inmunología Celular y Molecular                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Agencia de financiamiento                              | FARVET S.A.C.                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Ubicación geográfica de la investigación               | Edificio: Laboratorio de Inmunología Celular y Molecular – FARVET S.A.C.<br>País: Perú<br>Departamento: Ica<br>Provincia: Chincha<br>Distrito: Chincha Alta<br>Calle: Car. Panamericana Nro. 766<br>(Kilometro 198.5 Frente al Supe Grifo)<br>Latitud: -13.4320409<br>Longitud: -76.1356049 |
| Año o rango de años en que se realizó la investigación | Marzo 2018 – Marzo 2019                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| URL de disciplinas OCDE                                | Biología celular, Microbiología<br><a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.00">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.00</a>                                                                                                                                                      |



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
(Universidad del Perú, Decana de América)

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGA  
GENETISTA BIOTECNÓLOGA  
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS)**

Siendo las 09:03 horas del 25 de abril de 2022, en el Salón de Grados Virtual de la Facultad de Ciencias Biológicas cuya dirección electrónica fue <https://zoom.us/j/91355997349?pwd=MUtOczJzV2c3T2N6N2JkNWk2b3B0dz09>, y en presencia del Jurado formado por los profesores que suscriben, se inició la sesión para optar al **Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga** de **ASTRID GLORIA POMA ACEVEDO**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° UNMSM-202100054959, la titulando expuso su Tesis: “**DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE DETECCIÓN DE CÉLULAS DE POLLO (LÍNEA CELULAR DF-1) INFECTADAS POR EL HERPES VIRUS DE PAVO (HVT) MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO**”, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 20, calificativo: Aprobado con máximos honores.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga** a **ASTRID GLORIA POMA ACEVEDO** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo grado, conforme a ley.

Siendo las 10:33 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 25 de abril de 2022.

**Mg. CLAUDIA BARLETTA CARRILLO**  
(PRESIDENTA)



Firmado digitalmente por VALDIVIA  
CUYA Martha Esther FAU  
20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 25.04.2022 10:53:25 -05:00

**Dra. MARTHA VALDIVIA CUYA**  
(ASESORA)

**Mg. PATRICIA WOLL TOSO**  
(MIEMBRO)

**Mg. NADIA VERA MUNÁRRIZ**  
(MIEMBRO)

El presente estudio es parte de los protocolos operacionales estándar (POEs) desarrollados en el Laboratorio de Inmunología Celular y Molecular, perteneciente a los “Laboratorios de Investigación y Desarrollo FARVET”.

La presente tesis ha sido totalmente financiada por la institución antes mencionada.

## **Dedicatoria**

Dedicado a todas aquellas personas que no permitieron que la dureza de las situaciones borre la bondad con la que ven el mundo.

## **Agradecimientos**

A mis padres, por confiar en mí en todo momento.

A mi hermanita por apoyarme siempre.

A la Dra. Martha Valdivia por su gran corazón, y su confianza a través de los años.

A todas las personas importantes en mi vida y las que lo serán.

## Índice general

|                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Lista de abreviaturas                                                                                             | 1  |
| Lista de tablas                                                                                                   | 4  |
| Lista de figuras                                                                                                  | 4  |
| Resumen                                                                                                           | 6  |
| Abstract                                                                                                          | 7  |
| I. Introducción                                                                                                   | 8  |
| II. Marco teórico                                                                                                 | 10 |
| III. Hipótesis y objetivos                                                                                        | 30 |
| IV. Materiales y Métodos                                                                                          | 31 |
| IV.1 Material biológico.                                                                                          | 31 |
| IV.2 Protocolo cultivo celular DF-1.                                                                              | 31 |
| IV.3 Protocolo de infección del cultivo celular DF-1 por rHVT-GPF.                                                | 32 |
| IV.4 Establecimiento del protocolo de detección y el mejor permeabilizador celular.                               | 33 |
| IV.5 Titulación del antisuero MDV (anticuerpo primario).                                                          | 37 |
| IV.6 Evaluación de la especificidad del antisuero MDV.                                                            | 40 |
| IV.7 Correlación entre la detección de células infectadas por rHVT-GPF, mediante el protocolo desarrollado y GFP. | 40 |
| IV.8 Detección de células DF-1 infectadas por diferentes MOI de HVT evaluadas en diferentes h.p.i.                | 43 |
| IV.9 Adquisición de data en el citómetro de flujo.                                                                | 44 |
| IV.10 Análisis estadístico.                                                                                       | 46 |
| V. Resultados                                                                                                     | 46 |

|                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| V.1 Evaluación del tipo de permeabilizador celular.                                                              | 46 |
| V.2 Titulación del anticuerpo primario (Antisuero MDV).                                                          | 48 |
| V.3 Determinación de la especificidad del antisuero MDV para la detección de células infectadas con HVT.         | 49 |
| V.4 Correlación entre la detección de células infectadas por rHVT-GPF, mediante el protocolo desarrollado y GFP. | 50 |
| V.5 Detección de células DF-1 infectadas por diferentes MOI de HVT evaluadas en diferentes h.p.i.                | 51 |
| VI. Discusión                                                                                                    | 53 |
| VII. Conclusiones                                                                                                | 62 |
| VIII. Recomendaciones                                                                                            | 63 |
| IX. Referencias bibliográficas                                                                                   | 64 |
| X. Anexos                                                                                                        | 76 |

## **Lista de Abreviaturas**

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

BSA: Albúmina de suero bovino (del inglés Bovine Serum Albumin)

CAV: Virus de anemia de pollos (del inglés Chicken Anemia Virus)

CEF: Fibroblasto de embrión de pollo (del inglés Chicken Embryo Fibroblast)

CVI988: Cepa viral vacunal MDV-2 atenuada, aislada en Instituto Veterinario Central (del inglés Central Veterinary Institute) cepa proveniente de la gallina 988 de la que fue aislada.

CST: Configuración y seguimiento del citómetro (CST del inglés Cytometer Setup and Tracking) BD Becton Dickinson® en el software BD FACSDiva v6. Evalúa la precisión del instrumento que a su vez permite determinar la sensibilidad de la resolución del citómetro.

DF-1: Línea celular fibroblasto de pollo (UMNSAH/DF-1) ATCC CRL-12203.

DMEM: Medio de cultivo águila modificada de Dulbecco (del inglés Dulbecco's Modified Eagle Medium).

DPBS: Solución salina taponada con fosfato de Dulbecco responsable de mantener el medio cultivo en el rango de pH 7.2-7.6 (del inglés Dulbecco's Phosphate Buffered Saline).

FACS: Clasificación de células activadas por fluorescencia.

FAPP: Presión positiva de aire filtrado (del inglés Filtered-Air Positive Pressure).

FSC: Archivo Estándar de Citometría de Flujo (del inglés Flow Cytometry Standard).

g: gravedades.

GaHV-2: Cepa Herpesvirus Gallid 2.

GaHV-3: Cepa Herpesvirus Gallid 3.

GFP: Proteína Fluorescente Verde (del inglés Green Fluorescent Protein).

HPRS: Estación de Investigación Avícola en Houghton (del inglés Houghton Poultry Research Station).

HVT: Herpes virus de Pavo (del inglés: Herpesvirus Turkey).

h.p.i.: Horas post infección.

IBDV: Virus de la enfermedad de la bursa Infecciosa. (del inglés Infectious Bursal Disease Virus).

IgY: Inmunoglobulina Y.

MeHV-1: Cepa Meleagrid Herpesvirus 1 o HVT.

MD: Enfermedad de Marek (del inglés Marek's Disease).

MDV: Virus de la enfermedad de Marek.

MDV-1: Virus de la enfermedad de Marek serotipo 1.

MDV-2: Virus de la enfermedad de Marek serotipo 2.

MOI: es la proporción de agentes (virus) y objetivos de infección (células) (del inglés Multiplicity of infection).

LMH: Línea celular epitelial de hígado de pollo ATCC CRL-2117.

LTV: Virus de laringotraqueitis (del inglés Laryngotracheitis Virus).

NDV: Virus de la enfermedad de Newcastle (del inglés Newcastle Disease Virus).

NMS: Suero normal de ratón (del inglés Normal Mouse Serum)

rHVT-GFP: Virus recombinante de HVT y GFP.

rHVT-IBDV: Virus recombinante de HVT y IBDV.

rHVT-NDV: Virus recombinante de HVT y NDV.

rHVT-LTV: Virus recombinante de HVT y LTV.

SPF: Se utiliza para describir a un animal de experimentación con la característica de ser Libre de Patógenos Específicos (del inglés Specific-pathogen-free).

FA: Formaldehído

TCID<sub>50</sub>: Se define como el logaritmo de la dilución del virus que produce efecto citopático en el 50% de los cultivos celulares (del inglés Median Tissue Culture Infectious Dose).

## Tablas

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de Herpesvirus de Pavo (HVT) o *Meleagrid* *Alfaherpesvirus* 1 (MeHV-1) (NCBI:txid37108).

**Tabla 2.** Datos para los fluorocromos Alexa Flúor® 647 y GFP

## Figuras

**Figura 1.** Árbol filogenético del género *Mardivirus*.

**Figura 2.** Principio de funcionamiento subyacente a un citómetro de flujo.

**Figura 3.** Componentes de un citómetro de flujo.

**Figura 4.** Esquema de la inmunofluorescencia.

**Figura 5.** Gen reportero GFP.

**Figura 6.** Diferentes permeabilizadores utilizados.

**Figura 7.** Dilución seriada del antisuero MDV.

**Figura 8.** Flujograma del protocolo de detección de células infectadas por HVT por Citometría de Flujo (Protocolo in house).

**Figura 9.** Células DF-1 infectadas con el virus HVT-GFP. Vista al microscopio de fluorescencia.

**Figura 10.** Visor de espectros para Alexa Flúor® 647 y GFP en BD® FACS Melody.

**Figura 11.** Esquema del procesamiento para la detección de células infectadas por HVT a varias h.p.i.

**Figura 12.** Evaluación de diferentes permeabilizadores.

**Figura 13.** Titulación mediante la dilución del antisuero MDV

**Figura 14.** Especificidad del antisuero MDV y NDV (Charles River) para la detección de células infectadas con HVT.

**Figura 15:** Análisis de la detección de células infectadas por HVT mediante el antisuero MDV (AF647), GFP y su correlación.

**Figura 16:** Detección de células DF-1 infectadas por MOI de HVT evaluadas en diferentes h.p.i.

## Resumen

El Herpes Virus de Pavo (HVT), utilizado como cepa vacunal para la enfermedad de Marek (MD) y vector para diversas vacunas recombinantes, es producido en cultivos celulares. Durante la elaboración de la vacuna el monitoreo de la infección es de gran importancia para caracterizar u optimizar los procesos de producción. Una de las principales técnicas para este fin es el PCR en tiempo real (RT-PCR); sin embargo, esta técnica evalúa tanto partículas infectivas como no infectivas. Las técnicas capaces de superar estas limitantes, como el TCID50 y el ensayo de placa, no suelen usarse para el monitoreo, pues demoran hasta 7 días para obtener resultados. Considerando estas limitaciones el objetivo de este trabajo fue desarrollar un protocolo que permita detectar células infectadas en 24 horas, a través de citometría de Flujo. El protocolo desarrollado, basado en la detección intracelular de proteínas virales mediante el uso del antisuero MDV, ha mostrado ser específico para células infectadas y ha sido capaz de detectar el incremento de éstas durante el periodo de cultivo. Con la finalidad de confirmar que el protocolo no esté subestimando o sobrestimando el porcentaje de células infectadas, células DF-1 fueron infectadas con un virus recombinante (rHVT) que expresaba la proteína verde fluorescente (HVT-GFP). Posteriormente evaluamos el porcentaje de células infectadas utilizando el protocolo desarrollado y paralelamente evaluamos el porcentaje detectado a través de la expresión de GFP. Mediante la correlación de Spearman observamos una alta correlación ( $r= 0.93$ ;  $p=0.011$ ) entre ambos resultados. En conclusión, el protocolo desarrollado es capaz de detectar proteínas virales intracelulares durante el proceso de infección.

Palabras clave: HVT, células DF-1, monitoreo de la infección, citometría de flujo.

## **Abstract**

Turkey Herpes Virus (HVT), used as a vaccine strain for Marek's disease (MD) and vector for various recombinant vaccines, is produced in cell cultures. During vaccine preparation, infection monitoring is of great importance to characterize or modify production processes. One of the main techniques for this purpose is real-time PCR (RT-PCR); however, this technique evaluates both infectious and non-infectious particles. Techniques for overcoming these limitations, such as TCID<sub>50</sub> and plaque testing, do not usually have frequency for monitoring, as they take up to 7 days to obtain results. Considering these limitations, the objective of this work was to develop a protocol that allows to detect infected cells in 24 hours, through flow cytometry. The protocol developed, based on the intracellular detection of viral proteins using the MDV chicken serum, has proven to be specific for infected cells and has been able to detect the increase in variations during the culture period. With the determination to confirm that the protocol is not underestimating or overestimating the percentage of infected cells, DF-1 cells were infected with a recombinant virus (rHVT) that expressed the green fluorescent protein (HVT-GFP). Subsequently, it evaluates the percentage of infected cells using the protocol developed and, in parallel, evaluates the percentage detected through GFP expression. Through Spearman's correlation, we observed a high correlation ( $r = 0.93$ ;  $p = 0.011$ ) between both results. In conclusion, the protocol developed can detect intracellular viral proteins during the infection process.

**Keywords:** HVT, DF-1 cells, infection monitoring, flow cytometry.

## I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Marek (MD) cuyo agente etiológico es el virus de la enfermedad de Marek serotipo 1 (MDV-1), es una enfermedad linfoproliferativa en pollos de engorde. Esta enfermedad es causante de grandes pérdidas en la cría comercial, afectando seriamente a la industria avícola (Rong *et al.*, 2014; Boodhoo *et al.*, 2016).

El principal mecanismo de prevención contra MD es la vacunación (Reddy, 1996). Actualmente, se usan tres cepas de vacunas de herpesvirus, entre ellas el herpesvirus de pavo (HVT) no patogénico en pollos, pero antigénicamente relacionado con MDV1. Este virus es también usado como vector de vacunas recombinantes para inducir la protección contra MD y otras enfermedades aviares infecciosas (Sadigh *et al.*, 2018).

La producción de vacunas, se realizan a través de la infección de líneas celulares con el HVT (Rong *et al.*, 2014), pues depende de la maquinaria celular para poder replicar y producir nuevos viriones (Schat, 2016) El éxito de este proceso depende de la eficacia de la infección del virus, por lo que esta debe ser monitoreada en diferentes tiempos claves para la infección, para que no existan variaciones significativas entre los lotes durante la producción de vacunas.

Actualmente, la eficacia de la infección se determina por diferentes técnicas, siendo la técnica de PCR cuantitativa (qPCR) la más rápida y que cuantifica la concentración de ADN o ARN viral (Hoeksema *et al.*, 2018). La limitante de esta técnica es que no es capaz de diferenciar entre virus infectivos de no infectivos, sobreestimando los resultados. La técnica de TCID50 y el ensayo de placa son capaces de superar estas limitantes, sin embargo, estas técnicas no son

utilizadas para el monitoreo pues demoran hasta 7 días para obtener resultados (Dilnessa y Zeleke, 2017) (Anexo 1).

La citometría de flujo es una técnica capaz de superar estas limitantes, ya que mediante la evaluación célula a célula y la detección de antígenos virales, es posible determinar el porcentaje de células infectadas (McSharry, 2000), además de ser un proceso automatizado, toma menos de 24 horas para obtener resultados (Anexo 1 y 2).

El objetivo del estudio fue desarrollar un protocolo que nos permita detectar el porcentaje de células infectadas por HVT mediante citometría de flujo, para ello se realiza la fijación, permeabilización, marcado y adquisición de células DF-1 infectadas con HVT, al citómetro de flujo.

Además, con la finalidad de confirmar que el protocolo desarrollado no esté subestimando o sobreestimando el porcentaje de células infectadas, células DF-1 fueron infectadas con un virus recombinante (rHVT) que expresaba la proteína verde fluorescente (HVT-GFP), así las células infectadas expresaran la proteína reportera, detectando por citometría de flujo el porcentaje de células infectadas, a la par estas células fueron sometidas al protocolo desarrollado. Esto nos permitió comparar el porcentaje de células infectadas detectadas por la expresión de GFP y el porcentaje de células infectadas detectadas por el protocolo aquí desarrollado.

## **II. MARCO TEÓRICO**

### **II.1. Enfermedad de Marek (MD)**

Esta enfermedad fue descrita por primera vez por Josef Marek en 1907, inicialmente como una enfermedad inflamatoria que afectaba solo a aves viejas, con una baja mortalidad. En las décadas posteriores investigadores de Europa y Estados Unidos describieron esta enfermedad con signos clínicos cada vez más graves y con un índice de mortalidad cada vez más alto (Atkins *et al.*, 2011). Fue a finales de la década de 1950 que se reportó la naturaleza predominantemente neoplásica de MD. En 1960 con el crecimiento de la industria avícola, esta enfermedad fue intensamente diseminada, matando aves jóvenes con una tasa de mortalidad, de más del 30% convirtiéndose en un problema mundial (Charlton y Bermudez, 2006).

Las principales características de la MD son los trastornos neurológicos, la inmunosupresión y la transformación neoplásica de las células T, localizadas alrededor de los nervios periféricos y los órganos viscerales de las aves (Torres *et al.*, 2019), afectando a aves jóvenes y causando mortalidad muy alta.

A lo largo del tiempo se ha demostrado que el principal mecanismo de prevención contra MD es la vacunación (Reddy, 1996); lo que ha llevado al uso generalizado de una gran variedad de vacunas entre atenuadas y recombinantes, sin la vacunación preventiva MD podría generar grandes pérdidas en la cría comercial, afectando seriamente a la industria avícola (Rong *et al.*, 2014; Boodhoo *et al.*, 2016). La industria avícola, como es conocida hoy, no se podría desarrollar sin un apropiado control de la enfermedad de Marek.

## **II.2 Virus de la enfermedad de Marek (MDV)**

La enfermedad de Marek es causada por el virus de la enfermedad de Marek (MDV) o herpesvirus de gallo 2 (GaHV-2), es un alfa-herpesvirus altamente oncogénico, que causa supresión inmune, linfomas malignos de células T y trastornos neurológicos en pollos (Calnek, 2001).

GaHV-2 o MDV -1 pertenece al género *Mardivirus*. Dentro de este encontramos también al GaHV-3, un herpesvirus no oncogénico también conocido como MDV-2, y herpesvirus de pavo 1 (HVT) o herpesvirus Meleagrid tipo 1 (MeHV-1), anteriormente conocido como MDV-3. Otra forma de clasificar a los MDV es en relación con las tasas de mortalidad y morbilidad en animales inoculados así esta se ha propuesto cinco patotipos de MDV: atenuado (a), levemente virulento (m), virulento (v), muy virulento (vv) y muy virulento más (vv+) (Witter, 1997).

## **II.3 Vacunas contra la MD**

A finales de la década de 1960 se aisló el virus de la enfermedad de Marek (MDV), de inmediato se desarrolló una vacuna. Biggs y sus colaboradores en la Estación de Investigación Avícola en Houghton (HPRS) Inglaterra, atenuaron el virus HPRS-16, mediante pasajes en cultivos celulares de riñón de pollo (Schat, 2016). Aunque la cepa HPRS-16 fue la primera vacuna disponible comercialmente, nunca llegó a ser ampliamente utilizada, pues fue sustituida pronto por HVT cepa FC126 esta es una vacuna proveniente del herpesvirus de pavos, similar antigénicamente, pero inocua en pollos, que fue desarrollada por Witter y colaboradores (1997).

Rispens del Instituto Veterinario Central (CVI) desarrolló una tercera vacuna junto a su colaborador, Maas, este había encontrado parvadas comerciales de

pollos con anticuerpos contra MDV pero sin la enfermedad. Posteriormente, él aisló una cepa de GaHV-2, de muy baja patogenicidad, de la gallina 988. Este aislamiento se convirtió en la vacuna CVI988 utilizada sobre todo en Europa, Australia, Sudamérica y Asia (Gimeno, 2008).

Durante la década de los 1970s, se dió un cambio de virulencia entre las cepas de MDV, cuando pollos vacunados con HVT sufrieron con mayor incidencia lesiones por el MDV. La vacuna HVT ya no era totalmente protectora contra algunas nuevas cepas de campo emergentes. Para esta nueva cepa, se cambió la estrategia de vacunación y se introdujeron vacunas bivalentes que incluían HVT y cepas de GaHV-3 no oncogénicas naturales (HVT+ MDV-2 cepa SB-1), esta última aislada por Schat y Calnek en 1970 (Schat, 2016). La incorporación de estas cepas mejoró la protección contra las cepas emergentes muy virulentas.

No se notificó evidencia de MD en parvadas vacunadas con CVI988 durante la década de 1980. Sin embargo, durante la década de 1990 hubo una incidencia significativa de MD en parvadas vacunadas con vacunas bivalentes (EE. UU.) y con CVI988 (Europa, Australia, Sudamérica y Asia). Esto sugirió que se había producido un cambio adicional en la virulencia. En los Estados Unidos, la aplicación de la vacuna CVI988 ha sido una solución al problema desde entonces. En países que ya usaban CVI988, el uso de vacunas polivalentes (las cuales abarquen GaHV-1, 2 y 3), la revacunación, la mejora de las técnicas de vacunación y un mejor control de otras enfermedades inmunosupresoras han sido las estrategias adoptadas para controlar la MD (Gimeno, 2008).

## II.4. HVT

El herpesvirus de los pavos (HVT) es un alfa-herpesvirus aislado en pavos en 1970, momento desde el cual es usado como vacuna contra la MD debido a la que es antigénicamente parecido a la MDV (Afonso *et al.*, 2001).

**Tabla 1: Clasificación taxonómica de Herpesvirus de Pavo (HVT) o *Meleagrid Alphaherpesvirus 1* (MeHV-1) (NCBI:txid37108).**

| <b>Herpesvirus de Pavo (<i>Meleagrid Alphaherpesvirus 1</i>)</b> |                                     |
|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Superreino:</b>                                               | Virus                               |
| <b>Orden:</b>                                                    | Herpesvirus                         |
| <b>Familia:</b>                                                  | Herpesviridae                       |
| <b>Subfamilia:</b>                                               | Alfaherpesviridae                   |
| <b>Género:</b>                                                   | <i>Mardivirus</i>                   |
| <b>Especie:</b>                                                  | <i>Meleagrid Alphaherpesvirus 1</i> |

Anteriormente, HVT se ha denominado como MDV-3, en la actualidad, HVT se clasifica como una cepa de virus diferente, *Meleagrid Alphaherpesvirus 1* (MeHV-1), que junto con el *Gallid herpesvirus 2* (MDV-1 o GaHV-2) y el *Gallid herpesvirus 3* (MDV-2 o GaHV-3) (Figura 1) forman el género *Mardivirus* (Gimeno *et al.*, 2016).

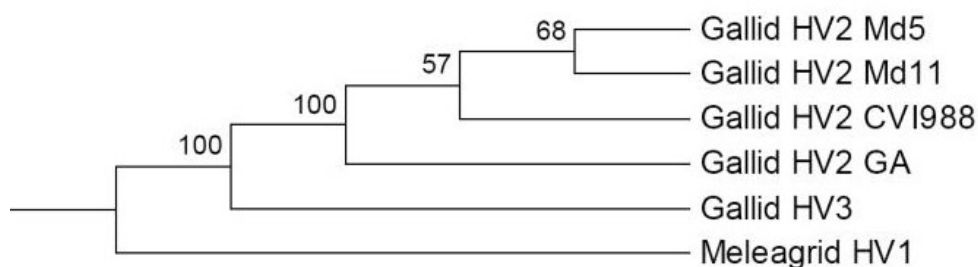


**Figura 1: Árbol filogenético del género *Mardivirus***, basado en 31 genes ortólogos de genomas de virus alfaherpes aviáres (Hughes y Rivailler, 2007). GaHV-2 causante de MD cepas vacunales como cepas infecciosas se hallan juntas, mientras que GaHV-3 y MeHV-1 virus semejantes usados como vacunas se hallan alejados.

El HVT se ha utilizado con éxito como vacuna contra la MD por más de 40 años, ya sea solo (en pollos de engorde), o en combinación con vacunas de otros serotipos (para pollos de engorde, gallinas reproductoras y de postura).

HVT no es patógena en los pollos, pero sí induce una viremia que se asocia con la inducción de respuestas inmunitarias protectoras contra la MD. HVT es considerado como uno de los vectores más potentes para las vacunas vivas polivalentes induciendo protección contra una serie de enfermedades aviares debido a su versatilidad y la seguridad en la administración *in ovo* o subcutánea en criaderos (Swayne, 2009).

En los últimos años, se han desarrollado varias vacunas con HVT como vector, demostrando ser un vector muy conveniente en el desarrollo de vacunas recombinantes (Cronenberg, 1999; Liu *et al.*, 2019). Varias vacunas rHVT tienen licencia en los Estados Unidos, como la rHVT con insertos de la enfermedad de la Bursa infecciosa (rHVT-IBDV) (Darteil *et al.*, 1995), el virus de la enfermedad de Newcastle (rHVT-NDV) (Sondermeijer *et al.*, 1993) y de la laringotraqueitis infecciosa (rHVT-ILT) están disponibles comercialmente y se usan ampliamente (Gimeno *et al.*, 2016).

## **II.5. Producción de vacunas HVT y rHVT.**

Como todos los herpesvirus, el HVT (MeHV-1) está estrictamente asociado a las células (Boodhoo *et al.*, 2016) es decir la mayor cantidad de estos permanece en su interior, hallando muy bajas cantidades en el medio extracelular por lo que es necesario su mantenimiento en cultivos celulares (Schat, 2016).

Solo unas cuantas líneas celulares, como la línea celular DF-1, son ampliamente usadas para la propagación y mantenimiento de cepas vacunales contra MD

(Sadigh, 2018; Rong *et al.*, 2014). Las DF-1 al ser células resistentes y de fácil cultivo pueden ser usadas para la propagación de los tres serotipos de MDV (Swayne, 2011), especialmente para HVT y rHVT.

DF-1 es una línea celular continua, inmortalizada espontáneamente de células de fibroblasto de embrión de pollo (CEF del inglés “Chicken Embryo Fibroblast”) extraídas de huevos de la línea “East Lansing” (ELL-0) de 10 días.

Las células DF-1 no albergan ningún virus endógeno conocido, además de presentar una uniformidad en su cultivo tanto en suspensión como en adherencia (Rekha *et al.*, 2019), lo que la hace propicia para cultivos a gran escala con la finalidad, ya sea, de expresar proteínas recombinantes o la producción de virus y virus recombinantes (Kim *et al.*, 2001).

## **II.6. Monitoreo de la producción virus**

El sistema de producción basado en el cultivo de células animales para la propagación de virus debe realizarse tomando en cuenta las reglamentaciones de Buenas Prácticas de Fabricación / Buenas Prácticas de Laboratorio.

Los procesos de producción de virus tienen un tiempo de duración establecido por la propia naturaleza del virus, ya sea en pequeña o gran escala. Durante estos procesos, se debe evaluar la correcta generación de virus en diversos tiempos post-infección como parte del monitoreo, para que no existan variaciones significativas entre los lotes durante la producción de las vacunas (Romanova, 2017).

El monitoreo rutinario de la producción de virus vacunales como el virus de la influenza, los cuales son también propagados en células, se realiza por métodos enzimáticos esto en la producción a gran escala (Kalbfuss *et al.*, 2008), mientras

que la estimación de proteínas y material genético viral, así como la cuantificación del virus, se usan de manera rutinaria para caracterizar los métodos de procesamiento a pequeña escala (Nayak y Reichl, 2004).

En el caso de la producción de cepas vacunas contra la enfermedad de Marek incluidas HVT y rHVT, la adaptación de protocolos a pequeña escala es rutinariamente evaluado por ensayo de placa TCID<sub>50</sub>, DICC<sub>50</sub>, PCR, qPCR, (Jaikumar *et al.*, 2001; Li y Schat, 2004; Rong *et al.*, 2014)

Sin embargo, para procesos a gran escala los ensayos de dosis infecciosa 50 de cultivo de placa o tejido (TCID<sub>50</sub>) y el ensayo de placa requieren de mucho tiempo en tener resultados (aproximadamente 1 semana) (Schulze-Horsel *et al.*, 2008), en general se evita usar métodos que consumen mucho tiempo, para el monitoreo de rutina de muestra extraídas de procesos a mediana o gran escala en la producción de vacunas (Nayak y Reichl, 2004).

En comparación con estos métodos tradicionales, un método de qPCR tiene muchas ventajas, que incluyen rapidez, medición cuantificable, mayor sensibilidad, mayor especificidad y facilidad de estandarización (Jang, 2011). Es por esto que es el método más comúnmente usado para el monitoreo rutinario en empresas dedicadas a la producción de vacunas como FARVET S.A.C. sin dejar de lado los métodos tradicionales.

En busca de un método rápido que brinde información sobre procesos celulares durante la infección viral, importantes para la optimización, se recurre al monitoreo de cultivos mediante la citometría de flujo. Este, ha demostrado ser una herramienta valiosa para investigar las influencias de las condiciones de cultivo celular y sus variaciones en el proceso de replicación y el rendimiento del

virus (Nordstrom *et al.* 1999; Logan *et al.*, 2019), usando como indicador la detección del porcentaje de células infectadas en determinados tiempos de la infección. Este es un proceso factible de implementar como método de monitoreo por su automatización, reproducibilidad y estandarización según lo recomendado en las pautas de tecnología analítica de procesos (PAT) de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) (Schulze-Horsel *et al.*,2008).

## **II.7. Citometría de flujo**

La citometría de flujo es un instrumento complejo que mide múltiples características físicas (tamaño, granularidad, etc.) y de fluorescencia de una sola célula, siendo estas derivadas de anticuerpos o colorantes asociados a moléculas fluorescentes. Todos estos datos obtenidos son tomados como parámetros para analizar y diferenciar las células (Macey, 2010; Wilkerson, 2012).

El principio subyacente de la citometría de flujo está relacionado con la dispersión de la luz y la emisión de fluorescencia, que ocurre cuando la fuente de excitación (el rayo láser) es dirigido hacia las células o partículas mientras estas fluyen en suspensión (Figura 2). La dispersión de la luz está directamente relacionada con las propiedades estructurales y morfológicas de la célula, mientras que la emisión de fluorescencia es proporcional a la cantidad de sonda fluorescente unida a la célula (Macey, 2010).

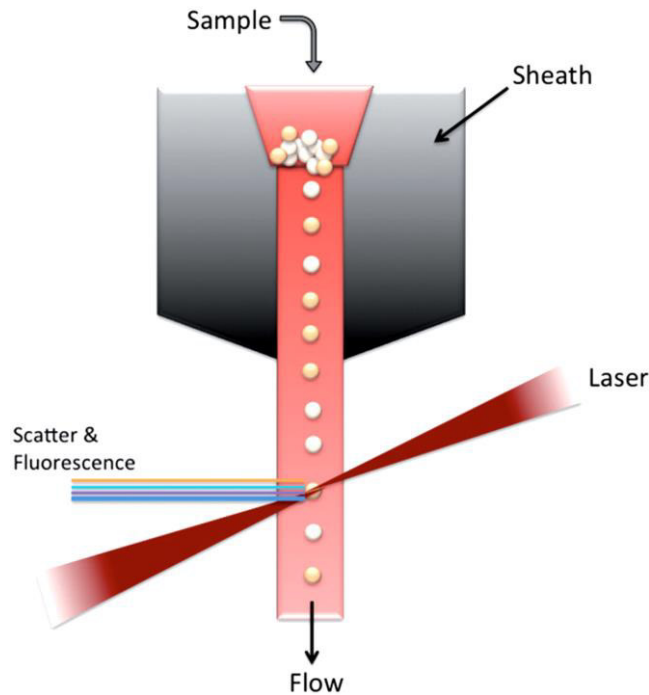


**Figura 2: Principio de funcionamiento subyacente a un citómetro de flujo.** La muestra con células es envuelta por el fluido de Sheath, para ser alineadas (enfoque hidrodinámico), de esta manera son incididas por el láser, generando una autofluorescencia y una fluorescencia proveniente de los fluoróforos incorporados a la muestra (Adan *et al.*, 2016).

Un citómetro de flujo se compone de tres sistemas principales: fluídico, óptica (excitación y recolección), una red electrónica (detectores) y una computadora (Figura 3).

El sistema fluídico es responsable de dirigir el líquido que contiene a las células o partículas a la fuente de luz enfocada (láser). El sistema óptico produce la excitación de la fuente de luz y enfoca en la fuente de luz a las células o partículas, al mismo tiempo este sistema mediante recolectores transmite la dispersión de luz o luz fluorescente hacia la red electrónica. Por último, la red electrónica detecta la señal y la convierte en datos digitales que son proporcionales a la intensidad de la luz y estos datos son analizados en la computadora acoplada a este sistema (Shapiro, 2004; Wilkerson, 2012).

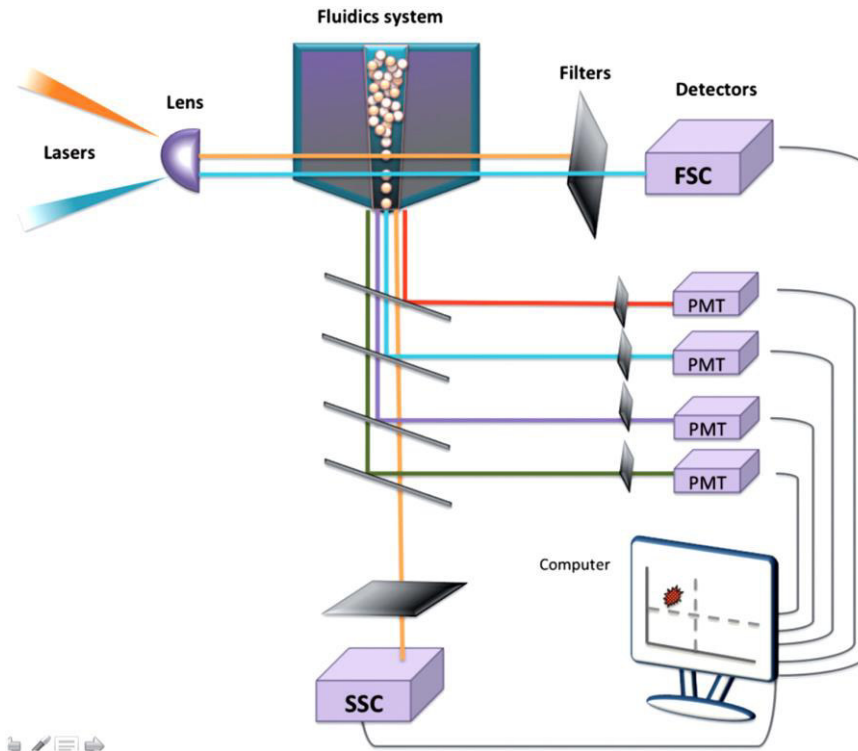


**Figura 3: Componentes de un citómetro de flujo.** El sistema fluido mediante el enfoque hidrodinámico enfila las células hacia el láser, a través del lente, incidiendo sobre la célula. Esta luz rebota de las células y son colectados por dos filtros uno va directamente hacia el detector FSC y el otro hacia SSC. Las señales fluorescentes incorporadas a las células son captadas de acuerdo a su longitud de onda por un espejo y un filtro, hacia los PMT de donde las señales son enviadas al computador (Adan *et al.*, 2016).

Existen dos tipos diferentes de citómetro de flujo, nombrados como: no clasificadores y clasificadores. Ambos poseen la capacidad de detectar la dispersión de luz y emisión de fluorescencia, sin embargo, los del tipo clasificadores conocidos como FACS tienen la capacidad de separar células marcadas con una determinada fluorescencia de una población de células mixtas (Wilkerson, 2012).

En tanto a las aplicaciones clínicas e industriales de la citometría de flujo, la detección de antígenos ubicados en la membrana, citoplasma o núcleo de la célula, son las más utilizadas. Además, las células enteras y los componentes celulares como orgánulos, núcleos, ADN, ARN, cromosomas, citocinas, hormonas y proteínas también pueden investigarse mediante citometría de flujo.

En tanto protocolos funcionales de las células, el análisis de la proliferación celular, el ciclo celular, las mediciones del flujo de calcio y los potenciales de membrana son métodos ampliamente desarrollados para citometría de flujo (Wlodkowic *et al.*, 2012).

## **II.8. Agrupamiento de datos en citometría de flujo**

### **II.8.1. Detección de células infectadas por citometría de flujo**

Durante el proceso de infección, las interacciones del virus y la célula pueden ser analizadas por citometría de flujo, mediante el uso de anticuerpos marcados con fluorocromo que detecten al agente patógeno en su interior. Durante más de 25 años, los estudios *in vitro* de interacciones virus-célula incluyen la detección y cuantificación de: (i) la unión de virus marcados con fluorocromos a sus receptores en las superficies celulares; (ii) células infectadas, mediante antígenos virales marcados con fluorocromos en la superficie celular, en el citoplasma y en el núcleo de las células infectadas con virus; (iii) apoptosis inducida por virus; y (iv) los efectos de la infección viral en la expresión de antígenos celulares y la síntesis de ácidos nucleicos (McSharry, 2000).

Los ensayos que han utilizado anticuerpos monoclonales y policlonales afines al patógeno a detectar, unidos a moléculas fluorescentes, para luego ser leídos al citómetro de flujo con el fin de detectar células infectadas por virus, son especialmente útiles en la determinación del progreso de la infección tanto en individuos infectados como en la producción de vacunas en cultivos celulares (Anexo 2).

Se han publicado protocolos que permiten la marcación fluorescente de células infectadas para diversos virus (Gueret *et al.*, 2002; Lonsdale *et al.* 2003; Lambeth

*et al.* 2005; Gates *et al.* 2009; Grigorov *et al.* 2011; Drayman y Oppenheim, 2011; Hammarlund *et al.* 2012).

Los protocolos para detectar células infectadas por virus, están determinados por pasos cruciales: (i) fijación de la célula, proceso que mantiene la estructura celular ante la permeabilización; (ii) la permeabilización de la célula, con el fin de acceder al interior de la misma, donde se hallan los objetivos virales; (iii) la marcación con anticuerpos específicos y anticuerpos fluorescentes que detecten a dichos anticuerpos, así las células fluorescentes al citómetro de flujo serán aquellas células que hayan sido infectadas (Anexo 2).

#### **II.8.1.1. Fijación**

Los agentes de fijación empleados en citometría pueden clasificarse en dos grandes grupos (Giloh, 1993) agentes exclusivamente fijadores y agentes que simultáneamente son fijadores y permeabilizadores de la membrana celular, como los alcoholes.

Entre los agentes exclusivamente fijadores merece especial mención fundamentalmente los derivados de aldehídos que fijan fundamentalmente a través de un proceso de reticularización proteica que básicamente la cual genera enlaces cruzados entre moléculas, pegándolas a la malla insoluble generada (Schmid *et al.*, 1991) y, por lo tanto, no permiten el acceso adecuado de colorantes a la célula. Entre estos agentes los dos más importantes son el formaldehído y el paraformaldehído.

El tamaño celular después de la fijación con aldehídos se altera en menor medida que mediante la fijación con acetona o alcoholes, esto es especialmente ventajoso pues la estabilidad de la membrana plasmática ayuda a que los

resultados de inmunomarcado sean reproducibles. La fijación con aldehídos tiende a presentar mayor fluorescencia inespecífica. Sin embargo, conserva mejor los espacios celulares y composicionales (Hobro y Smith, 2017).

La mayoría de los métodos usados en citometría de flujo para la tinción intracelular usan fijadores y permeabilizadores por separado, esto para conservar la estructura celular y proceder con la permeabilización que permite que los anticuerpos accedan a las estructuras intracelulares. Sin fijación las estructuras dentro de la célula podrían desmoronarse y desaparecer antes de tener la oportunidad de terminar las incubaciones de anticuerpos (Schmid *et al.*, 1991).

#### **II.8.1.2. Permeabilización**

Con el fin de acceder a los antígenos intracelulares, las células primero deben permeabilizarse, especialmente después de la fijación con agentes de reticulación tales como formaldehído. La permeabilización permite tener acceso a antígenos en intracelulares o intraorganelares (Anexo 3).

Se usan comúnmente dos tipos generales de reactivos; solventes orgánicos (metanol y acetona), o detergentes (saponina, Tritón X-100 y Tween-20). Los solventes orgánicos suelen ser usados como fijadores permeabilizadores (coagulan las proteínas además de disolver los lípidos de las membranas celulares). En el caso de los detergentes como agentes permeabilizantes, la saponina, un glucósido vegetal, interactúa con el colesterol de la membrana y lo elimina selectivamente, formando así agujeros de aproximadamente 100Å en la membrana (Seeman, 1973). Esto le permite incorporar anticuerpos a través de las micelas saponina/colesterol que facilitan su entrada en las células. La

permeabilización de la saponina no es efectiva en las membranas con contenido pobre de colesterol como las membranas mitocondriales y la envoltura nuclear (Goldenthal, 1983).

Los detergentes no iónicos como Tritón X-100 y Tween 20 también se usan ampliamente para permeabilizar células y tejidos. Estos detergentes contienen grupos de cabeza hidrófilos sin carga que consisten en restos de polioxietileno. La desventaja de estos detergentes es que no son de naturaleza selectiva y pueden extraer proteínas junto con los lípidos, dando como resultado un falso negativo durante el procedimiento de inmunofluorescencia (Jamur y Oliver, 2009).

#### **II.8.1.3. Inmunofluorescencia**

La inmunofluorescencia es un ensayo que se usa principalmente en muestras biológicas y se define clásicamente como un procedimiento para detectar antígenos en contextos celulares usando anticuerpos (Goding, 1996). La especificidad de los anticuerpos contra su antígeno es la base para la inmunofluorescencia. Las muestras biológicas incluyen tejidos y células. La inmunofluorescencia permite a los investigadores evaluar si las células de una muestra particular expresan o no el antígeno en cuestión. En los casos en que se encuentra una señal inmunopositiva, la inmunofluorescencia también permite a los investigadores determinar qué compartimentos subcelulares expresan el antígeno. La inmunofluorescencia se puede usar en líneas celulares cultivadas, secciones de tejido o células individuales (Burrell *et al.*, 2017).

La inmunofluorescencia se ha utilizado ampliamente en la investigación biológica y el rendimiento de la investigación médica y se ha convertido en uno de los

métodos más importantes y efectivos (Kao *et al.*, 2001). Al ser usada conjuntamente a la citometría de flujo y al FACS ha permitido el análisis rápido, sensible, cuantitativo y objetivo de células individuales, y también la posibilidad de separación celular sobre la base de antígenos de membrana y / u otros parámetros como el contenido de ADN, dispersión de luz, flujo de calcio y pH intracelular, o de hecho cualquier otra propiedad que pueda medirse utilizando técnicas ópticas. El análisis y la clasificación multiparamétricos son ahora procedimientos bien establecidos (Goding, 1996).

Hay dos tipos: el ensayo de inmunofluorescencia: indirecta y el ensayo de inmunofluorescencia directa. Para el ensayo de inmunofluorescencia indirecta, el protocolo incluye principalmente fijación de tejidos o células, bloqueo del suero, incubación de anticuerpos primarios, específico al antígeno patógeno a detectar, incubación del segundo anticuerpo fluorescente (que se une al primero), y lectura (Figura 4A). Para el ensayo de inmunofluorescencia directa, los pasos son semejantes, la única diferencia es que solo hay un anticuerpo primario, que además es fluorescente, que se incuba sin tener la necesidad de un segundo anticuerpo (Figura 4B).

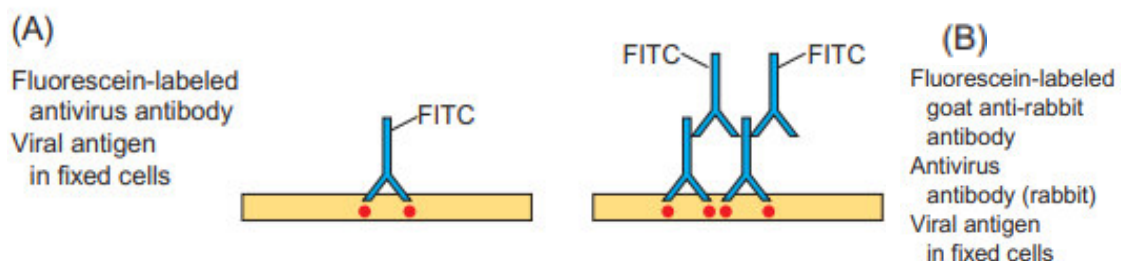


**Figura 4: Esquema de la inmunofluorescencia.** (A) Método directo. El anticuerpo antiviral asociado a la fluoresceína reconoce un antígeno viral en células fijadas. (B) Método indirecto. El anticuerpo de cabra anti-conejo, asociado a la fluoresceína, se une al anticuerpo de conejo antiviral, este está unido al antígeno viral en la célula fijada (Burrell *et al.*, 2017).

## **A) Antisuero contra el MDV**

Un antisuero es un suero obtenido de un animal inmunizado. La inmunización es el proceso de introducción de un inmunógeno (antígeno), una molécula que es reconocida por el sistema inmune y es capaz de inducir una reacción inmune. La respuesta inmunitaria consiste en una red de respuestas humorales y celulares. La respuesta humoral consta de anticuerpos específicos, estos son un tipo de proteínas séricas responsables de la inmunidad humoral (Shah y Ershler, 2007).

Los anticuerpos son sintetizados por las células plasmáticas (células B) y pueden ser hallados en el suero. Por lo tanto, un suero que contiene una concentración de anticuerpos elevada para un antígeno particular, esto es lo que mayormente es llamado antisuero contra ese antígeno (Thanavala, 1998).

Se deben evaluar varios parámetros para establecer la calidad y la utilidad de un antisuero. Estos son especificidad, título y afinidad, la característica más destacada de un buen antisuero es la especificidad. La mayoría de los antígenos expresan una gran cantidad de epítomos, contra cada uno de ellos, pueden suscitarse diferentes anticuerpos. Un antisuero altamente específico es aquel que reacciona solo con epítomos del antígeno utilizado y no a otros antígenos que se parecen.

En este caso el antisuero MDV es un antisuero policlonal monoespecífico producido en pollos SPF negativos para CAV. Las aves utilizadas en la producción de antisueros suelen ser aisladas en instalaciones de barrera de FAPP. Las aves son monitoreadas para optimizar los niveles de anticuerpos.

Los antisueros estandarizados como el antisuero para la enfermedad de Marek se producen para obtener altos niveles de actividad neutralizante, sin embargo, antes de ser comercializados pasan por una variedad de aplicaciones de laboratorio, como inmunodifusión, inhibición de la hemaglutinación (HI) e inmunotransferencia. ("Avian Antigens & Antisera | Charles River", 2020) (Anexo 4).

### **B) Anticuerpo asociado a fluoróforo**

Un anticuerpo es asociado a un fluoróforo con el fin de etiquetarlo, este etiquetado fluorescente para anticuerpos se ha convertido en una herramienta común en los laboratorios para visualizar y estudiar proteínas, ya sea que estén unidas directamente a la al anticuerpo que reconoce al antígeno de interés (IFD) o a anticuerpos que reconocerán a los anticuerpos específicos que reconocen al antígeno de interés (IFI).

El acoplamiento de fluoróforos a anticuerpos para crear reactivos de anticuerpos marcados fue reportado por primera vez por Coons y colaboradores (1941), esto gracias al grupo funcional succinimidil-éster del anticuerpo, este unido al núcleo del fluoróforo (FluoReporter FITC Protein Labeling Kit, Molecular Probes, Invitrogen). Destacando que hay un límite para la cantidad de moléculas de fluorescencia que se pueden unir a un anticuerpo (Vira *et al.*, 2010).

La fluorescencia acoplada a los anticuerpos tiene la propiedad de emitir radiación electromagnética en forma de luz como resultado de la absorción de luz de otra fuente. Las moléculas (generalmente hidrocarburos poliaromáticos o heterociclos) llamados fluoróforos, fluoróchromos o tintes

fluorescentes absorben la luz elevando su nivel de energía a un breve estado excitado. A medida que se descomponen de este estado excitado, emiten luz fluorescente.

En la práctica, la configuración del sistema de detección (el microscopio de fluorescencia, el microscopio confocal o el citómetro de flujo) juega un papel importante en la intensidad de fluorescencia detectada. La fuente de luz, el filtro de excitación, el espejo dicróico, el filtro de emisión y el objetivo contribuyen a la intensidad de la imagen de fluorescencia.

Entre los agentes fluorescentes usados en citometría de flujo, el más famoso de estos es el isotiocianato de fluoresceína (FITC, colorante verde) sin embargo, su intensidad fluorescente es dependiente de pH, para solucionar estos problemas es que “Molecular Probes” desarrolla la familia de tintes “Alexa Flúor” con la intención de mejorar las propiedades de los colorantes fluorescentes biológicos.

Estructuralmente, Alexa Flúor se genera a través de la sulfonación y la modificación adicional de ciertos fluoró cromos como la cumarina, rodamina, xanteno (fluoresceína estándar) y tintes de cianina (Rai *et al.*, 2018).

## **II.9 Virus Recombinantes**

Un virus recombinante es un virus producido mediante la recombinación de fragmentos de ADN utilizando tecnología de ADN recombinante, más recientemente haciendo uso de la tecnología CRISPR / Cas9 como un método rápido y eficiente para generar virus recombinantes, para editar el genoma y agregar otros antígenos virales en el genoma de vectores, tal como el HVT, para el rápido desarrollo de vacunas recombinantes (Tang *et al.*, 2019)

Se ha estudiado en una amplia gama de virus por su potencial como vacunas recombinantes cada uno de ellos con características únicas y con la capacidad de inducir diferentes tipos de respuestas inmunes (Souza *et al.*, 2005).

### II.9.1. Reportero GFP

Entre los virus recombinantes más simples encontramos aquellos generados por la inserción de un gen reportero en un sitio no esencial en el genoma, conservando así el repertorio de genes virales (Figura 5). La presencia del gen informador permite el fácil seguimiento de la infección viral lítica por sus propiedades químicas (en el caso de Lac Z) o fluorescentes (reportero GFP) (Figura 9) (McGregor *et al.*, 2013).

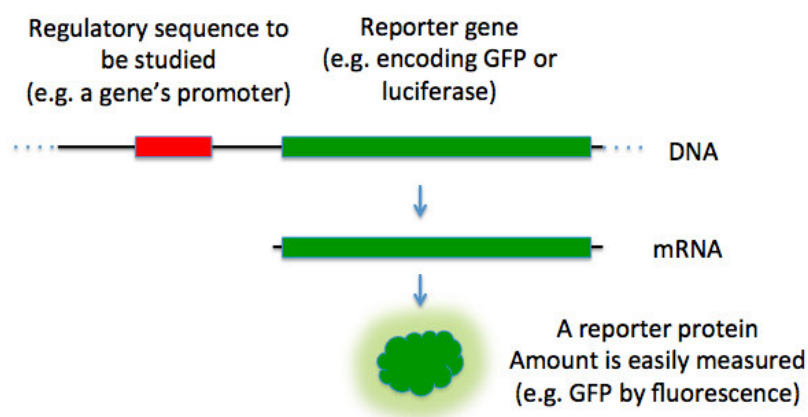


**Figura 5: Gen reportero GFP**, ubicado cerca al gen promotor. El proceso de transcripción resulta en ARN mensajero, la traducción genera la proteína reportera GFP (Debnath *et al.*, 2009).

La proteína fluorescente verde (GFP) fue aislada en el año 1962 (Shimomura *et al.*, 1962) de un extracto obtenido de la medusa bioluminiscente *Aequorea victoria* (Prasher *et al.*, 1992), esta proteína es fluorescente naturalmente y no necesita de intermediarios para su expresión en cualquier organismo, vivo conservando su propiedad fluorescente incluso dentro de organismos distintos a la medusa.

Un gen reportero en biología celular se define al uso de genes como marcadores de expresión de una secuencia de interés. Así mediante la fluorescencia de GFP es posible monitorear la expresión virus intracelulares sin necesidad de intervenir con el cultivo, una simple observación al microscopio o adquisición al citómetro nos permitirá saber que tanto el virus se ha replicado (Franco *et al.*, 2009).

### **II.9.2. rHVT-GFP**

Las proteínas fluorescentes se incorporan a virus recombinantes, por la facilidad de detección que confieren en tiempo real mediante microscopía fluorescente y citometría de flujo. El gen informador fluorescente más común es la proteína fluorescente verde GFP, por lo que las versiones actuales de este gen informador se han modificado para permitir altos niveles de auto fluorescencia y, en consecuencia, una fácil detección.

Una ventaja adicional del uso de proteínas fluorescentes es el pequeño tamaño del casete a introducir al virus, esto permite que el etiquetado de constructos virales contenga esta proteína fluorescente de manera estructural. Un virus etiquetado con GFP permite un fácil seguimiento en tiempo real, lo cual es extremadamente útil para el estudio final del virus (McGregor *et al.*, 2013).

El HVT es ampliamente usado como una plataforma de vectores para la generación de vacunas recombinantes contra una serie de enfermedades aviares utilizando métodos de recombinación convencionales o herramientas de edición genética como CRISPR / Cas9, este último es uno de los métodos más ampliamente usados actualmente, insertando no solo otros antígenos virales (Tang *et al.*, 2019) sino también reporteros como GFP.

Así el constructo HVT-GFP es la base la generación de vacunas recombinantes HVT. Solo hace falta colocar junto a GFP el antígeno de interés, así en el cultivo se podrá aislar solo aquellas células que la expresen. Siendo HVT-GFP ampliamente usada en los procesos de recombinación de HVT por diversas empresas generadoras de vacunas (Souza *et al.*, 2005).

### **III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **III.1. Hipótesis**

El protocolo desarrollado detecta el porcentaje de células DF-1 infectadas por Herpes Virus de Pavo (HVT) mediante citometría de flujo.

#### **III.2. Objetivo general**

Desarrollar un protocolo para detectar el porcentaje de células DF-1 infectadas por Herpes Virus de Pavo (HVT) mediante Citometría de Flujo.

#### **III.3. Objetivos específicos**

1. Establecer el protocolo de detección y el mejor permeabilizador celular.
2. Determinar el título de antisuero MDV (anticuerpo primario) a usar y evaluar su especificidad a HVT.
3. Determinar la correlación de los porcentajes de células infectadas por rHVT-GFP detectadas mediante la expresión de GFP y el protocolo a desarrollar.
4. Detectar el incremento del porcentaje de células DF-1 infectadas por diferentes MOI de HVT evaluadas en diferentes tiempos post infección mediante el protocolo de detección por citometría de flujo.

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **IV.1. Material biológico**

#### **IV.1.1. Alícuota viral del virus rHVT-GFP**

Se empleó una alícuota del virus rHVT-GFP que fue diseñado por edición genética mediante CRISPR / Cas9 fue provista amablemente por el Laboratorio de Biotecnología Molecular y Genómica II, perteneciente a los “Laboratorios de Investigación y Desarrollo FARVET”, que permanece conservada en nitrógeno líquido.

#### **IV.1.2. Células inmortalizadas de fibroblasto de Pollo DF-1**

Las alícuotas de las células DF-1 congeladas en alícuotas de  $5 \times 10^6$  células pertenecen al banco de células de los “Laboratorios de Investigación y Desarrollo FARVET” ubicadas en la cámara fría. Las alícuotas celulares congeladas no albergan ningún virus endógeno conocido, además de ser estables y uniformes históricamente al ser cultivadas, tanto en suspensión como adherencia.

### **IV.2. Protocolo cultivo celular DF-1**

La alícuota de células DF-1 ("UMNSAH/DF-1 ATCC ® CRL-12203™ *Gallus gallus* embryo", 2020) fue descongelada y cultivada en medio DMEM (Anexo 7), según el Anexo 6.

El momento del subcultivo se realizó a las 24 o 48 horas al llegar a una confluencia del 70-80% (Anexo 8), llegado a este punto se retiró el medio de cultivo y se agregó 1 ml de Tripsina-EDTA, dejando incubar por 7 minutos a 41°C. Después de este tiempo se observó al microscopio invertido comprobando que las células se despeguen de la base y se hallen esféricas en el sobrenadante.

Se agregó 5 ml de medio DMEM 10%SBF, se retiró todo el contenido en un tubo cónico y fue centrifugado a 200g por 5 minutos. El sobrenadante fue descartado y las células fueron re suspendidas con 2 ml de medio DMEM 10% SBF para determinar la concentración celular de la suspensión mediante conteo en la cámara de Neubauer. Se volvió a cultivar a la concentración deseada, según capacidad de insumos expresado en el Anexo 9. Una vez terminado el tiempo de cultivo las células son cosechadas y conociendo la concentración celular ya conocidas expresadas en el Anexo 10, se procedió a separar  $1 \times 10^6$  células en microtubos de 1.5 ml.

#### **IV.3. Protocolo de infección del cultivo celular DF-1 por rHVT-GFP**

Previamente se preparó  $1.6 \times 10^6$  células DF-1 sanas en 5 ml de medio DMEM 10% SBF tibio y se le agrego 0.5 ml de rHVT-GFP a un MOI de 2.5 se mezcló por vortex y se vertió a un Flask T-75. Se dejó incubar a 41°C 5% CO<sub>2</sub> por 24 horas. Se retiró la totalidad del medio, y se agregó 5 ml de medio fresco. Se incubó por otras 24 horas. Vigilando la fluorescencia de la GFP mediante microscopia de fluorescencia. Este Flask fue subcultivado 4 veces, cada vez con espacio de 48 horas, la replicación y fluorescencia del virus fueron estables en todo este periodo de tiempo.

Estas fueron des adheridas una vez llegaron a una confluencia de 90% (aproximadamente  $8.12 \times 10^6$  células). Usando 1.5 ml de tripsina-EDTA, se dejó incubar por 7 minutos a 40 °C. Se agregó 15 ml de DMEM 10% SBF para inactivar la tripsina. Se centrifugó a 200g por 5 minutos y resuspendido con 2 ml de DMEM al 10% SBF. Se halló la concentración de células, usando 10 µl de la suspensión celular diluida 1:1 con Azul de tripán, contar en la cámara de Neubauer. Conociendo la concentración separar  $1 \times 10^6$  células en microtubos

de 1.5 ml. Después de esto las células se encontraban ya infectadas con el virus y disponibles a ser usadas en los siguientes experimentos.

Este procedimiento es igual al usado para la infección de células con HVT cepa vacunal, provisto por el área de producción de FARVET S.A.C.

#### **IV.4. Establecimiento del protocolo de detección y el mejor permeabilizador celular.**

La elección del mejor permeabilizador celular se realizó probando 3 tipos de permeabilizadores celulares: el kit Cytofix/Cytoperm de BD (Pharmingen, San Diego, CA) (Anexo 11); el detergente suave saponina de Quillaja bark en polvo (sigma) (Anexo 14) diluida al 0.5% con DPBS y el detergente fuerte Tritón X-100 (Omnipur) diluida al 0.5% con DPBS (Figura 6). La preparación de todos los reactivos usados figura en el Anexo 12.

El permeabilizador celular es determinado con la línea celular LMH (células de hígado de pollo inmortalizadas químicamente), sensibles a ser infectadas con LTV. Las células sanas e infectadas con LTV a los cuales se le aplicó los siguientes protocolos fueron provistas por el área de producción de FARVET S.A.C.  $1 \times 10^6$  células, en tubos de 1.5 ml.

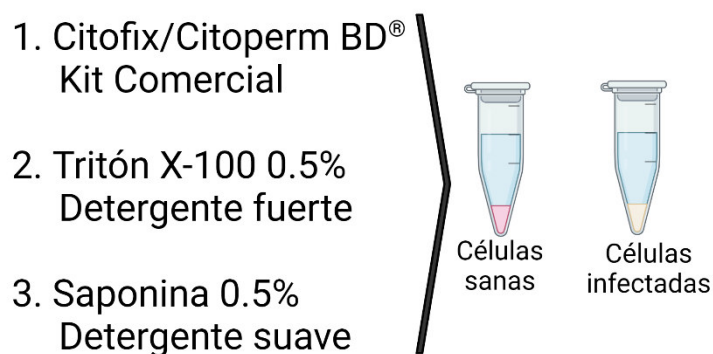


**Figura 6: Diferentes permeabilizadores utilizados.** para la detección de células infectadas por citometría de flujo. Cada protocolo fue aplicado a células infectadas tomando como control de marcación a células sanas.

#### **IV.4.1. Kit Cytofix/Cytoperm BD**

Para realizar la fijación y permeabilización de las células se siguió las indicaciones del fabricante, (BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit, 2021) (Anexo 11). Las células fueron lavadas con DPBS, fijadas y permeabilizadas, fueron bloqueadas con la solución Perm/Wash+5% NMS de suero bovino y se incubó a 4°C durante 1 hora. Se diluyó el anticuerpo policlonal de pollo para el virus de laringotraqueitis (ab30491), 1/800 con la solución Perm/Wash+5%NMS, se agregó 50 µl de esta dilución a cada tubo a marcar. Se incubó 3 horas a 4 °C (mezclando al vortex en intervalos de 1 hora). Se procedió a lavar agregando 500 µl de la solución Perm/Wash, centrifugando a 300 g por 5 minutos a 4°C (esto se realizó 2 veces). Para agregar el anticuerpo secundario, se diluyó el anticuerpo policlonal de cabra específico para IgY de pollo asociado al fluoróforo Alexa Fluor® 488, 1/800 con la solución Perm/Wash+5%BSA. Se agregó 50 µl esta dilución, dejando incubar por 30 minutos a 4°C. Terminada la incubación se agregó 500µl de la solución Perm/Wash, se centrifugó a 300g por 5 minutos a 4°C (esto se realizó 2 veces). El sobrenadante fue descartado por inversión. El pellet fue resuspendido con 400 µl de DPBS. Estos fueron vertidos a tubos de citometría y adquiridos al citómetro Gallios (Beckman Coulter®).

#### **IV.4.2. Protocolo con Saponina 0.5%- *In House***

Protocolo desarrollado en base a lo expresado en Drayman y Oppenheim (2011), basado en la permeabilización mediante el detergente Saponina (Prod.Nº. S4521-Sigma) (Anexo 14).

Las células fueron centrifugadas a 200g por 5 minutos a 4°C. Una vez descartado el sobrenadante por inversión, el pellet fue resuspendido con 1 ml de DPBS (esta operación fue realizada 2 veces). Para fijar las células se colocó el tubo al vortex y se agregó 100 µl de la solución formaldehído al 4%. Se incubó por 20 minutos protegido de la luz. Se agregó 1 ml de DPBS+5%SBF, centrifugando a 400 g por 5 minutos a 4°C, (esta operación fue realizada 2 veces). El sobrenadante fue descartado y el pellet resuspendido. Para la permeabilización y bloqueo, el tubo fue colocado al vortex y se agregó 100 µl de la solución saponina 0.5%+ 5%BSA. Esto se incubó a T° ambiente (22°C) por 1 hora. Después se agregó 300 µl de saponina a 0.5%, para después centrifugarla a 500 g por 5 minutos a 4°C. Se descarta el sobrenadante por inversión. Se procede con la incubación con el anticuerpo primario, el anticuerpo policlonal de pollo para el virus de laringotraqueitis (ab30491) se diluyó, 1/800 con la solución saponina 0.5%+5%BSA. Se agregó 50 µl de esta dilución a cada tubo a marcar y se incubó por 3 horas a T° ambiente (mezclando al vortex a intervalos de 1 hora). Se agregó 1 ml de saponina 0.5%, para después centrifugar a 300 g por 5 minutos a 4°C, (esta operación fue realizada 2 veces). Se descartó el sobrenadante y se rompió el pellet. Se procedió con la incubación del anticuerpo secundario, el anticuerpo policlonal de cabra específico para IgY de pollo asociado al fluoróforo Alexa Flúor® 488 se diluyó 1/3200 con la solución de saponina 0.5%+5%BSA. Se agregó 50 µl esta dilución, se dejó incubar por 30 minutos a 4°C. Al finalizar se agregó 1 ml de saponina al 0.5%, se centrifugó a 300 g por 5 minutos a 4°C (esto se realizó 1 vez más, pero con 500µl de saponina 0.5%). El pellet fue resuspendido con 400 µl de

DPBS. Estos fueron vertidos a tubos de citometría y adquiridos al citómetro Gallios (Beckman Coulter®).

#### **IV.4.3. Protocolo Tritón X-100 0.5% - *In House***

Protocolo desarrollado en base a los expresado en Lambeth (2005). Las células fueron centrifugadas a 200 g por 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante por inversión, el pellet fue resuspendido con 1 ml de DPBS (esta operación fue realizada 2 veces). Para realizar la fijación de las células se colocó el tubo al vortex y se agregó 100 µl de la solución formaldehído al 4%, se dejó incubar a T° ambiente por 15 minutos. Se agregó 1 ml de DPBS+5%SBF, centrifugando a 400 g por 5 minutos a 4°C, (esta operación fue realizada 2 veces). El sobrenadante fue descartado y se rompió el pellet. Se procedió con la permeabilización el tubo fue colocado al vortex y se agregó 100 µl de la solución Tritón X-100 al 0.5%. Se incubó por 20 minutos a T° ambiente. Se agregó 300 µl de DPBS, centrifugando a 500g por 5 minutos a 4°C. Se procedió con el bloqueo agregando 100 µl de la solución DPBS+5%NMS, se dejó incubar a T° ambiente por 30 minutos. Se agregó 300 µl de DPBS, centrifugando a 500g por 5 minutos a 4°C. Se procedió con la incubación del anticuerpo primario, para esto el anticuerpo policlonal de pollo para el virus de laringotraqueitis (ab30491), se diluyó 1/3200 con la solución DPBS+5%BSA. Se agregó 50 µl de esta dilución a cada tubo a marcar y se incubó por 3 horas a T° ambiente (mezclar al vortex en intervalos de 1 hora). Se agregó 1 ml de saponina 0.5%, centrifugando a 300g por 5 minutos a 4°C, (esta operación fue realizada 2 veces). Se procedió con la incubación del anticuerpo secundario, el anticuerpo policlonal de cabra específico para IgY de pollo asociado al fluoróforo Alexa Flúor® 488 se diluyó

1/800 con la solución de saponina 0.5%. Se agregó 50 µl esta dilución, incubando por 30 minutos a 4°C. Se agregó 1 ml de DPBS, centrifugándolo a 300g por 5 minutos a 4°C (esta operación fue realizada 2 veces). El pellet fue resuspendido con 400 µl de DPBS. Estos fueron vertidos a tubos de citometría y adquiridos al citómetro Gallios (Beckman Coulter®).

#### IV.5. Titulación del antisuero MDV (anticuerpo Primario)

Se utilizaron células infectadas con HVT a las 48 horas post infección, y células sanas como control. Para la detección de estas se utiliza un antisuero específico a MDV (Anexo 4) estrechamente relacionado a HVT. Las células infectadas como sanas se sometieron al siguiente protocolo, variando la concentración de antisuero MDV mediante una dilución seriada (Figura 7).

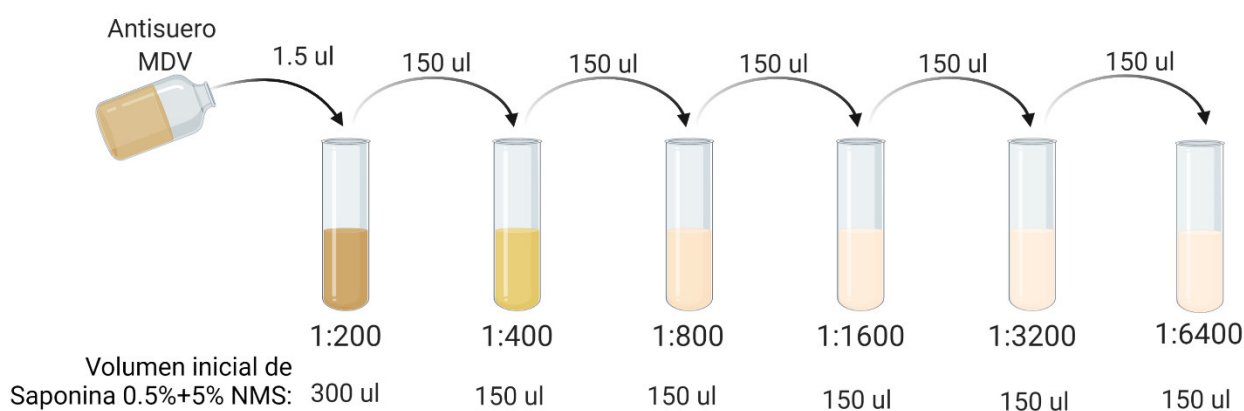


**Figura 7: Dilución seriada del antisuero MDV.** La muestra es diluida a la mitad en cada pasaje. Esto es recomendado para altas concentraciones de anticuerpos. La dilución seriada es realizada transfiriendo 150 µl cada vez. En la figura se muestra la dilución inicial, hasta dilución final realizada.

El protocolo seleccionado fue el “protocolo con Saponina 0.5%- *in House*” (IV.4.2) con algunas modificaciones para hacerlo compatible con las células DF-1 y el virus HVT:

#### **IV.5.1. Protocolo de detección de células DF-1 infectadas con HVT por citometría de flujo (Protocolo *in house*)**

Tanto células sanas como infectadas fueron centrifugadas a 200g por 5 minutos a 20°C, se eliminó el sobrenadante por inversión, el pellet fue resuspendido con 1 ml de DPBS (esta operación fue realizada 2 veces). Para la fijación se colocó el tubo al vortex y se agregó 100 µl de la solución formaldehído al 4% (FA 4%). Se incubó por 20 minutos protegido de la luz. Se agregó 1 ml de DPBS+5%SBF, centrifugando a 400g por 5 minutos a 20°C, (esta operación fue realizada 2 veces). Para la permeabilización y el bloqueo el tubo fue colocado al vortex y se agregó 100 µl de la solución saponina 0.5%+ 5%NMS. Esto se incubó a T° ambiente por 1 hora. Se agregaron 300 µl de la saponina a 0.5%, para después ser centrifugarlo a 500g por 5 minutos a 20°C. Para realizar la incubación con el anticuerpo primario (titulación del antisuero MDV), se realizaron diluciones seriadas de antisuero MDV (Figura 7), se agregó 50 µl de cada dilución, a un tubo con células sanas y a otro con células infectadas. Se incubó durante 3 horas a T° ambiente, (mezclando al vortex en intervalos de 1 hora).

Se agregó 1 ml de saponina 0.5%, para después centrifugar a 300 g por 5 minutos a 20°C, (esta operación fue realizada 2 veces). Para la incubación con el anticuerpo secundario, se diluyo el anticuerpo secundario, policlonal de cabra específico para IgY de pollo asociado al fluoróforo Alexa Flúor® 647, 1/1600 con la solución de saponina 0.5%+5%NMS. Se agregó 50 µl esta dilución, incubando por 30 minutos a T° ambiente. Se agregó 1 ml de saponina al 0.5%, se centrifugó a 300g

por 5 minutos a 20°C (esta operación fue realizada 2 veces). El pellet fue resuspendido con 400 µl de DPBS. Estos fueron pasados a tubos de citometría y adquiridos al citómetro BD® FACS Melody.

Todos los pasos resumidos se hallan en la Figura 8. La preparación de todos reactivos usados en el protocolo figura en el Anexo 13.

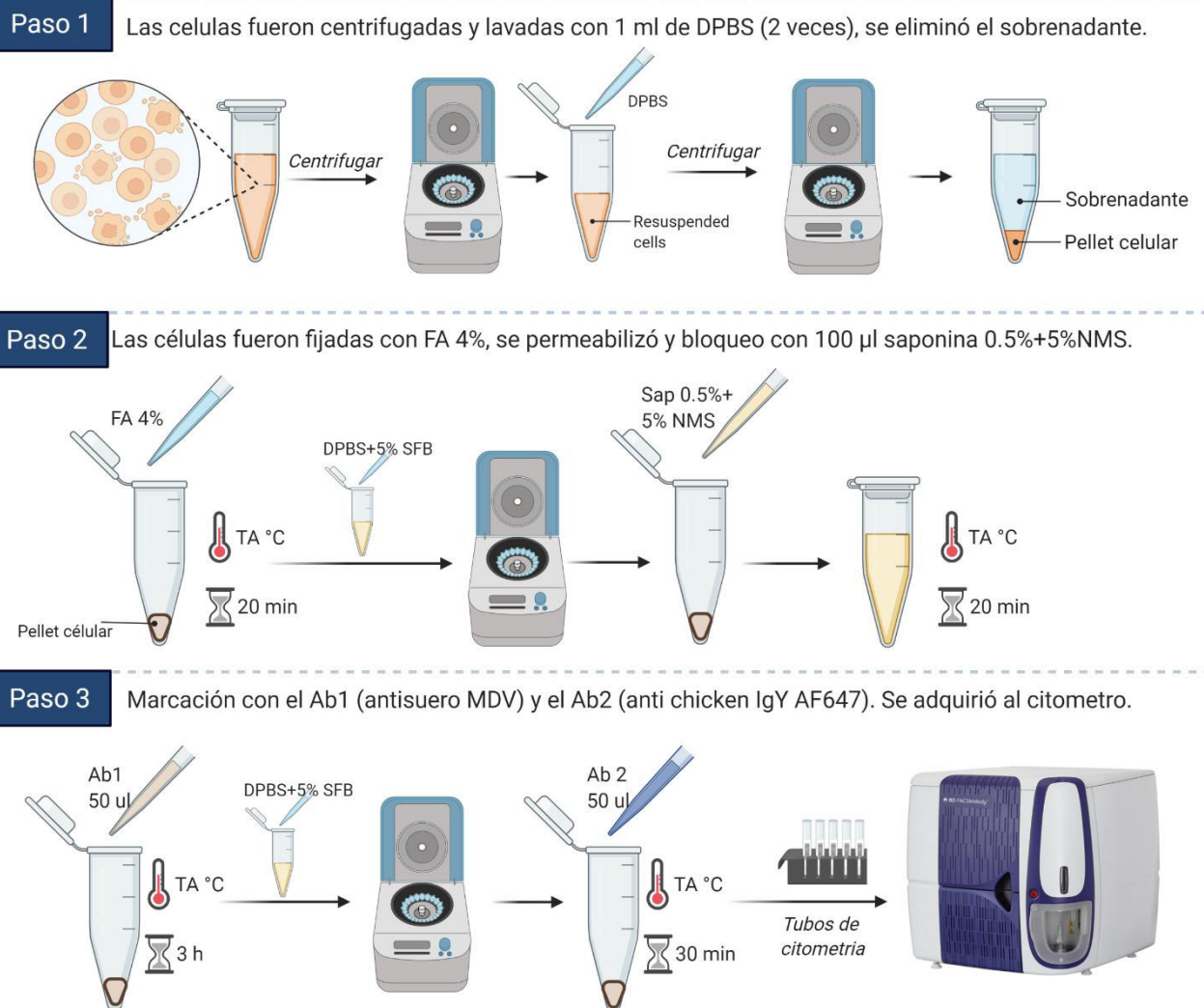


**Figura 8: Resumen del “protocolo de detección de células DF-1 infectadas con HVT por citometría de flujo (Protocolo *in house*)”.** Cada paso es descrito, en resumen, para fines didácticos se han repartido en 3.

#### **IV.6. Evaluación de la especificidad del Antisuero MDV**

La especificidad fue determinada al comparar los porcentajes detectados por el “protocolo de detección de células DF-1 infectadas con HVT por citometría de flujo (Protocolo *in house*)” (Figura 8) en células DF-1 infectadas con HVT (MOI de 0.1) a las 24 y 48 h.p.i. usando tanto el antisuero MDV (dilución 1/3200) como el antisuero NDV (dilución 1/3200), ambos antisueros proceden de la misma casa comercial, sometidos al mismo proceso de fabricación y controles de calidad (Anexo 4 y Anexo 5).

#### **IV.7. Correlación entre la detección de células infectadas por rHVT-GFP , mediante el protocolo desarrollado y GFP.**

El protocolo de infección de células por el virus recombinante rHVT-GFP es propiedad de FARVET S.A.C y fue generado por la tecnología CRISPR / Cas9. El protocolo de infección de células DF-1 por este virus, fue descrito anteriormente. La totalidad de células infectadas fueron subcultivadas a intervalos de 48 horas obteniendo 3 pasajes (Figura 9), esto para acumular un buen stock viral. Las células en cada pasaje fueron examinadas bajo el microscopio de fluorescencia Observer.A1 (Carl Zeiss, Alemania). Las imágenes de la señal fluorescente se tomaron a un aumento de 400X con la cámara AxioCam MRc5 (Carl Zeiss, Alemania).

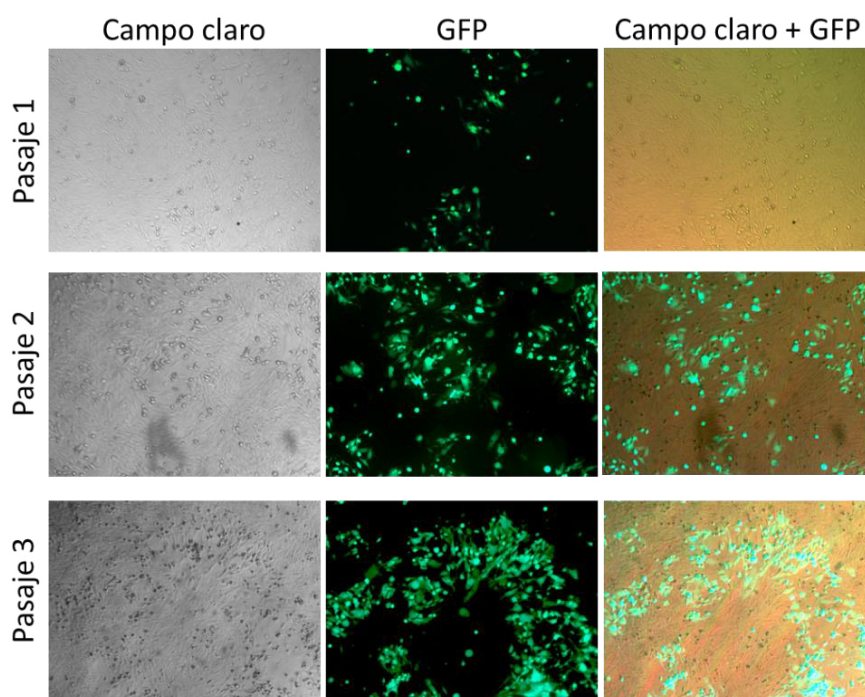


**Figura 9: Células DF-1 infectadas con el virus rHVT-GFP. Vista al microscopio de fluorescencia.** Los tres pasajes realizados, muestran el aumento de células brillantes alrededor de la placa formada, las células brillan en verde gracias a la proteína citoplasmática GFP. Visualizado al microscopio de fluorescencia Observer.A1 (Carl Zeiss, Alemania). Las imágenes de la señal fluorescente se tomaron a un aumento de 400X con la cámara AxioCam MRc5 (Carl Zeiss, Alemania).

Las células fueron subcultivadas, contadas en la cámara de Neubauer y separadas en tubos de 1.5 ml conteniendo  $1 \times 10^6$  células en cada uno. Como control se usaron células DF-1 rHVT sin marcar y células DF-1 sanas.

Las células obtenidas fueron sometidas al “protocolo de detección de células DF-1 infectadas con HVT por citometría de flujo (protocolo *in house*)” (Figura 8), con el fin de que el antisuero MDV (dilución 1/3200) detectara el porcentaje de células infectadas presentes en las células. Estas últimas fueron también determinadas por la expresión de GFP, así el porcentaje determinado por el “protocolo *in house*” fue comparada con el porcentaje positivo a la fluorescencia GFP.

Así se tendrían dos porcentajes a comparar, uno determinado por antisuero MDV junto al anticuerpo secundario con Alexa Flúor® 647 (excitación / emisión = 650

/ 665 nm), y el segundo porcentaje determinado por la fluorescencia GFP (excitación / emisión = 490 / 522 nm).

La fluorescencia GFP y Alexa Flúor® 647 pertenecen a diferentes espectros de emisión, por lo que no presentan solapamientos y no requieren de compensación para comprobarlo recurrimos al Visor de Espectros BD® (Figura 10).

**Tabla 2: Datos para los fluorocromos Alexa Flúor® 647 y GFP.** Longitud de onda máxima de excitación, longitud de onda máxima de emisión. Laser y filtro utilizado.

| Fluorocromo             | Excitación (max) | Emisión (max) | Laser | Filtro |
|-------------------------|------------------|---------------|-------|--------|
| <b>Alexa Flúor® 647</b> | 650              | 668           | Rojo  | 670/20 |
| <b>GFP</b>              | 490              | 509           | Azul  | 510/20 |

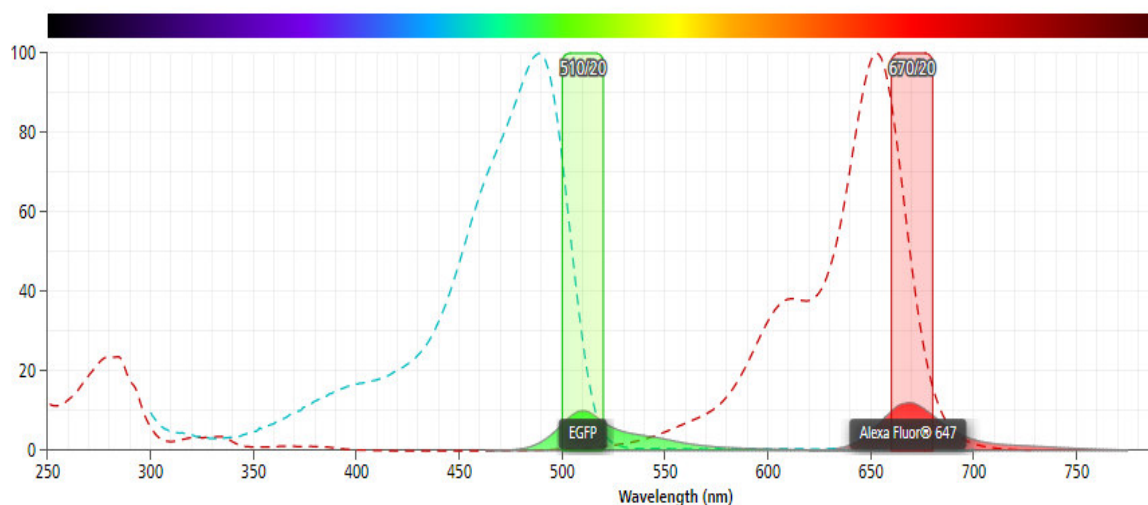


**Figura 10: Visor de espectros para Alexa Flúor® 647 y GFP en BD® FACS Melody**, GFP en verde y Alexa Flúor® 647 en rojo. Las líneas punteadas, representan el espectro de excitación. Líneas continuas, representan el espectro de emisión. Ambas fluorescencias, no presentan solapamiento (BD Bioscience 2020).

#### IV.8. Detección de células DF-1 infectadas por diferentes MOI de HVT evaluadas en diferentes h.p.i.

Las células infectadas por dos MOIs 0.01 y 0.02 de HVT fueron cosechadas a diferentes tiempos post infección: 24 horas, 48 horas, 72 horas y 90 horas (figura 11). Después se procedió a aplicar el “protocolo de detección de células DF-1 infectadas con HVT por citometría de flujo (protocolo *in house*)” (Figura 8), con la dilución 1/3200 del antisuero MDV.

Para la evaluación de cada MOI y h.p.i., se utilizó como control células sanas. Estas últimas acompañan a la muestra infectada en todo el proceso y determinaron donde se marcaría el agrupamiento de positividad para células infectadas con HVT. Este experimento se llevó a cabo por duplicado.

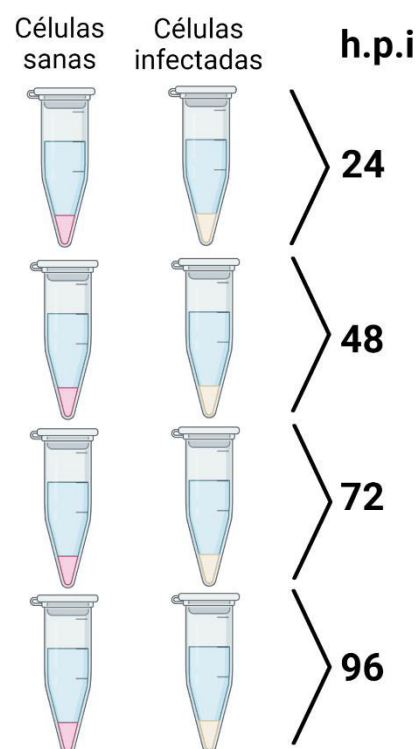


**Figura 11: Esquema del procesamiento para la detección de células infectadas por HVT a varias h.p.i.** Tantas células sanas como células infectadas fueron procesadas para los diferentes horarios post infección. Con el fin de evaluar el incremento de células infectadas.

#### **IV.9. Adquisición de data en el citómetro de flujo**

El equipo usado para determinar el protocolo y permeabilizador celular fue el citómetro Gallios (Beckman Coulter), todos los controles fueron apropiadamente realizados, según lo recomendado por el fabricante. Se realizó el encendido del láser azul y la muestra fue adquirida.

El “protocolo de detección de células DF-1 infectadas con HVT por citometría de flujo (protocolo *in house*)” (Figura 8) fue realizado con el citómetro de flujo BD® FACS Melody, de igual manera los controles CST y Accudrop fueron utilizados para calibrar el equipo cada vez que fue usado, según lo recomendado por el fabricante. Para realizar la adquisición se utilizaron los láseres correspondientes a la longitud de excitación para los fluoróforos Alexa Flúor 647® y GFP (Tabla 2). Los datos fueron adquiridos una vez la corriente de flujo fue estable, eliminado los efectos de obstrucción, contra presión y otros problemas de instrumento.

##### **IV.9.1. Adquisición y generación de gráficos**

Se adquirieron 30 000 eventos al citómetro de flujo Gallios y FACS Melody. Los formatos fueron exportados en formato FCS, extraídos y analizados por el programa de análisis Kaluza 4.1. (Beckman Coulter, Inc. 2012) y Flow jo v.10.0.6 (Treestar, Inc. 2013), respectivamente.

##### **IV.9.2. Estrategia de Agrupamiento.**

Para la adquisición de la data al citómetro de flujo se construyó una plantilla de adquisición constituida de 3 ventanas. 1º FS-A vs SS-A, 2º FS-A vs FS-H; 3º AF647 vs SS-A (Anexo 15). En el caso de las células que contenían GFP, se requirió construir una cuarta ventana GFP vs SS-A.

En la primera ventana FS-A vs SS-A, se regularon los voltajes del láser, para detectar la totalidad de las células. Removiendo de la adquisición aquellos eventos más pequeños (debris celular) u otros eventos que no sean de interés. En esta ventana se agruparon solo aquellos eventos que correspondan al tamaño y la complejidad de las células DF-1, previamente adquirida al citómetro. Este agrupamiento será llamado “P1”.

La segunda ventana FS-A vs FS-H, ambos ejes corresponden a características físicas de la célula, en este caso son la altura del pulso generado y el área que abarca el pulso, aquellas células que pasaron por el láser de manera individual, se ubicaron al centro de la ventana. Por lo que la agrupación realizada en esta ventana se usó para eliminar dobletes. Esta agrupación se trazó de forma lineal y fue llamada “P2”.

La tercera ventana APC vs SS-A fue construida a partir de P2. Esta tiene por un lado la complejidad de las células (SS-A) y por otro lado la fluorescencia, del anticuerpo secundario (APC). Las células que brillaron con mayor intensidad se ubicaron al lado derecho de la ventana. Esta agrupación a modo de línea separadora fue llamada “HVT+”.

En el caso de la cuarta ventana GFP vs SS-A. También fue construida a partir de P2. Al igual que la tercera ventana se trazó una agrupación a modo de línea separadora, llamada “GFP+”.

Primero se adquirieron al citómetro las células control (sanas), y luego las células infectadas. Al adquirir las sanas primero, nos permitió ajustar el voltaje de la adquisición, con la certeza de que la fluorescencia que presentaban era marcación inespecífica.

Así antes de adquirir las células infectadas, las ventanas (P1, P2, HVT+, y GFP+) ya habían sido construidas. En el caso de la tercera y cuarta ventana (HVT+ y GFP+) se ajustaron los voltajes y el agrupamiento con el fin de tener un porcentaje inespecífico (dado por la adquisición de las células sanas) menor al 1%.

#### **IV.10. Análisis estadístico**

Se realizó utilizando el software GraphPad Prism v. 6.00 (GraphPad Software Inc, 2010).

Para el experimento de correlación entre la expresión de GFP y la detección de células infectadas por el presente protocolo, se usó el coeficiente de correlación de Pearson (Anexo 21) para determinar la relación lineal entre estas dos variables continuas. Se estableció un p-value menor a 0.05 para determinar significancia.

### **V. RESULTADOS**

#### **IV.1. Evaluación del tipo de permeabilizador celular.**

El porcentaje de células LMH infectadas por laringotraqueitis, obtenidas por el uso de los diferentes permeabilizadores y el kit Cytofix/Cytoperm BD, son adquiridas al citómetro de flujo. En los gráficos se expresa el porcentaje de células infectadas detectadas por citometría de flujo, tanto células sanas como infectadas fueron sometidos a los diferentes protocolos.

Cada permeabilizador provee una determinada auto fluorescencia, tanto para sanas como para infectadas, en la ventana de las células sanas el agrupamiento solo abarca un porcentaje menor al 1%.

Así el tritón fue el que más auto fluorescencia determinó tanto para sanas como infectadas. Esto genera que una parte el agrupamiento de células infectadas no se halle dentro de la ventana. Además, que en la adquisición el número de eventos fue menor. Con el uso de detergente tritón se detectó un porcentaje de 12.8% (Figura 12C).

Se usó como referencia el kit de BD, identificando un 22% de células infectadas (Figura 12A). Usando como detergente a saponina se detectó un total de 30.7% de células infectadas (Figura 12C).

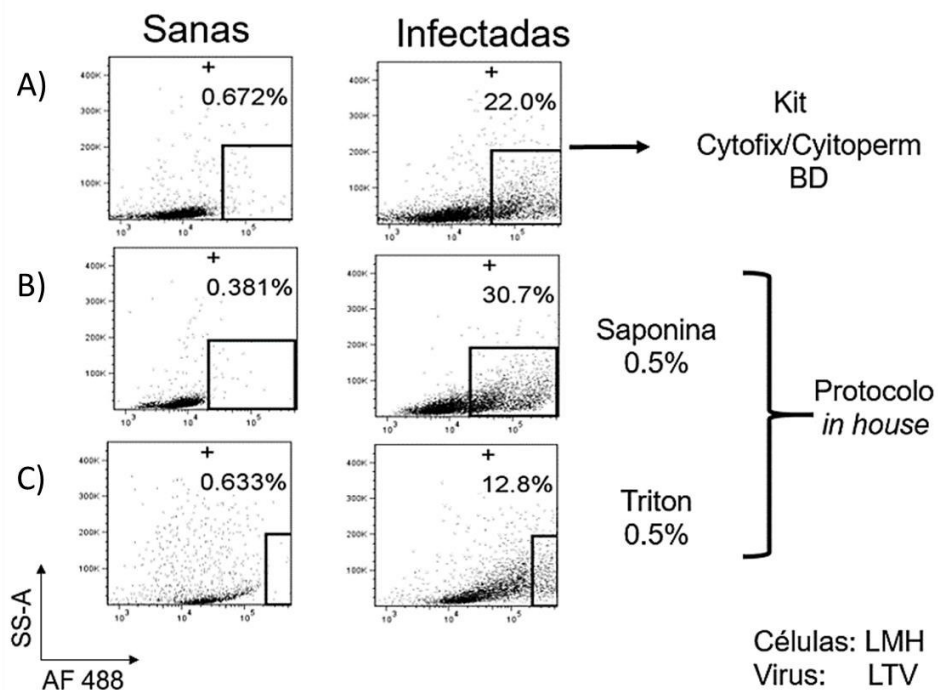


**Figura 12: Evaluación de diferentes permeabilizadores**, para la detección de células LMH infectadas con ILTV. (A) Kit Cytofix/Cytoperm. (B) Saponina 0.5% protocolo *in house*. (C) Tritón al 0.5% protocolo *in house*.

Entre todos los tratamientos, las células LMH permeabilizadas con saponina al 0.5% tienen mejores resultados. Tanto por el índice de marcado (separación entre positivas y negativas en el gráfico) como, el porcentaje de células infectadas detectadas. Cabe resaltar que tanto para el tratamiento con el Kit Cytofix/Cytoperm y con el detergente Tritón 0.5%, las células en el fondo del tubo

fueron disminuyendo en cada centrifugación, a partir de la aplicación del permeabilizante.

#### IV.2. Titulación del anticuerpo primario (Antisuero MDV).

Se determinó la dilución de antisuero a usar para reconocer la menor cantidad de marcación inespecífica, y la mayor cantidad de células infectadas detectadas (Figura 13). El gráfico de puntos resultante de la adquisición de cada dilución figura en el Anexo 16

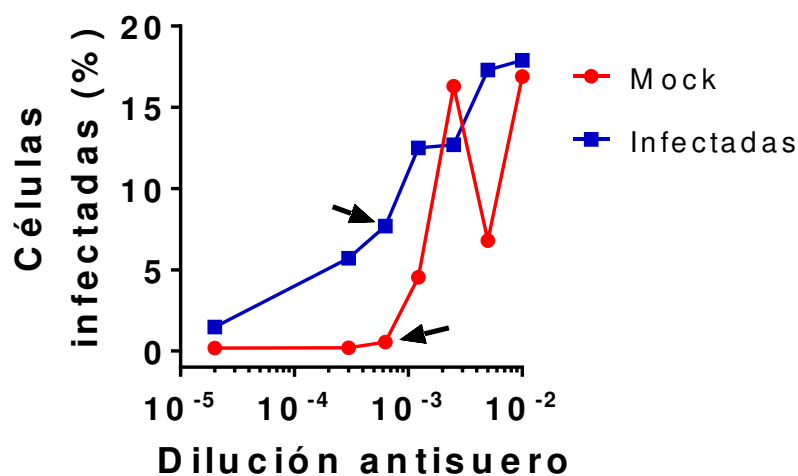


**Figura 13: Titulación mediante la dilución del antisuero MDV.** Cada dilución obtiene un porcentaje de “células infectadas” incluso en las células DF-1 sanas (mock). Cada punto representa un tratamiento, nombrados de izquierda a derecha, 1º “sin suero”, 2º 1/6400, 3º 1/3200, 4º 1/1600, 5º 1/800, 6º 1/400 y 7º 1/200. Las flechas negras señalan a la dilución 1/3200.

En la figura 13 se puede reconocer, para cada dilución, el porcentaje de células marcadas. En las diluciones más altas a partir de 1/1600, un gran porcentaje de células sanas son marcadas como células infectadas. La dilución 1/800 presenta un marcado inespecífico mucho mayor que la anterior, y muy parecida a la primera dilución. El marcado inespecífico de células sanas por el antisuero MDV parece no poseer una proporción directa a la cantidad usada.

En la dilución más baja (1/6400), si bien la cantidad de marcación inespecífica fue baja, no es la dilución donde se detecta la mayor cantidad de células infectadas.

La dilución 1/3200 es el punto donde se detecta la mayor cantidad de células infectadas, pero a la vez, la segunda menor cantidad de células sanas, marcadas de manera inespecífica.

#### IV.3. Determinación de la especificidad del antisuero MDV para la detección de células infectadas con HVT.

El antisuero presenta anticuerpos contra el agente patógeno, al ser policlonales pueden presentar inespecificidad en la marcación. El protocolo de detección (Figura 8) se realizó usando la dilución 1/3200 del antisuero MDV y NDV en células infectadas a dos horarios post infección 24 y 48 horas, en ambos casos, el antisuero Newcastle no determinó aumento la fluorescencia, es decir no detectó de manera inespecífica a las células infectadas con HVT.

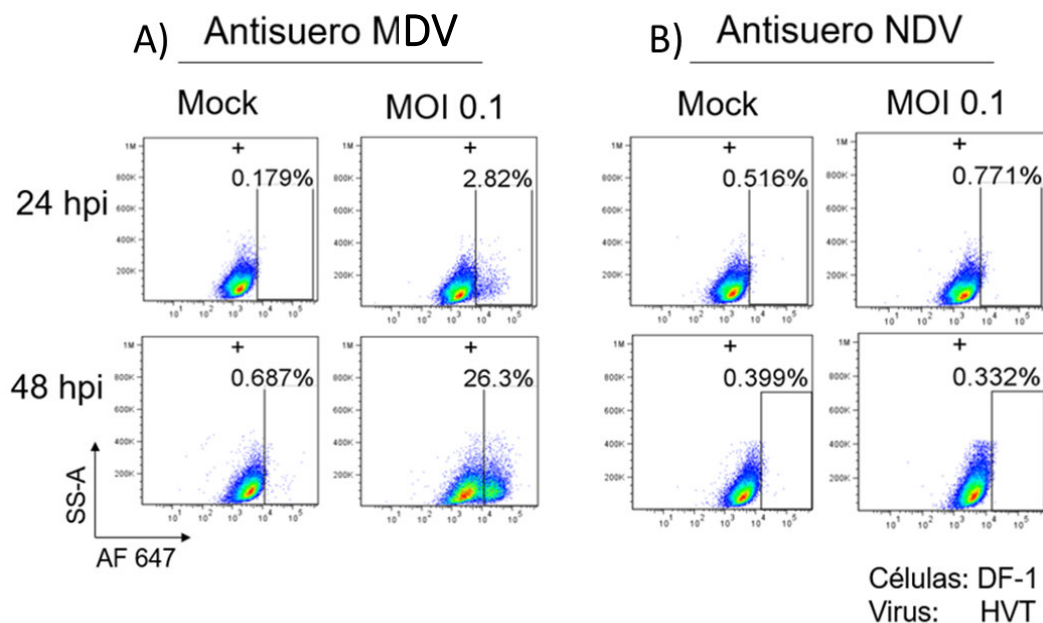


**Figura 14: Especificidad del antisuero MDV y NDV (Charles River) para la detección de células infectadas con HVT.** A) Antisuero MDV, detección de células infectadas a 24h y 48h. B) Antisuero NDV no detecta células infectadas por HVT, ni un porcentaje inespecífico en las células sanas.

En el caso del antisuero MDV (Figura 14A), las células sanas no son marcadas inespecíficamente, las células infectadas detectadas incrementaron, según el tiempo post infección, de 2.8% (24 h.p.i) a 26.3% (48 h.p.i). Para el antisuero NDV (Figura 14B) no se halló una población de eventos positivos a AF647.

El análisis completo de las gráficas de citometría obtenido en cada muestra se encuentra en el Anexo 17.

#### **IV.4. Correlación entre la detección de células infectadas por rHVT-GFP, mediante el protocolo desarrollado y GFP.**

Las células infectadas con el rHVT-GFP son sometidas al protocolo de detección (Figura 8), obteniendo el porcentaje de células infectadas por el antisuero MDV junto a la fluorescencia del anticuerpo secundario Alexa® 647 (Figura 15A) y el porcentaje de células infectadas por rHVT-GFP detectadas por la fluorescencia de GFP (Figura 15B), ambos datos son evaluados por citometría de flujo. El uso de ambas fluorescencias en el mismo panel de lectura no interviene una con la otra.

Se evaluaron en 3 diferentes pasajes post infección realizado en intervalos de 48 horas (Figura 9), para el pasaje 1 se extrajo una muestra, para el pasaje 2 y 3 se extrajeron 2 muestras de cada uno, todas estas muestras fueron sometidas al “protocolo de detección de células infectadas con HVT por citometría de flujo (Protocolo *in house*)” (Figura 8), la data completa obtenida figura en el Anexo 19 y el gráfico de puntos resultante de los porcentajes obtenidos, en el Anexo 20.

Usando el coeficiente de correlación de Pearson (Figura 13C) esta presenta una relación positiva grande:  $r=0.96$  siendo esta relación estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) (Anexo 21).

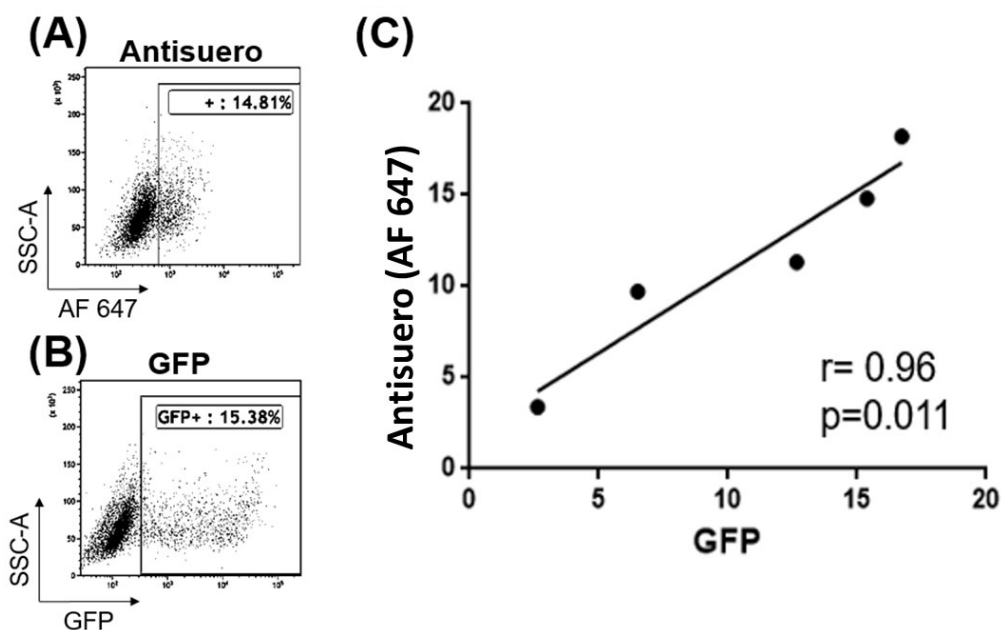


**Figura 15: Análisis de la detección de células infectadas por HVT mediante el antisero MDV (AF647), GFP y su correlación.** (A) Gráficos de la detección células infectadas por HVT, por antisero y por GFP en porcentaje, este gráfico corresponde a uno de cultivos analizados para el pasaje 3 de DF-1 rHVT (Anexo 19). (B) Correlación entre el porcentaje de células infectadas detectadas por la expresión de GFP vs el porcentaje de células infectadas detectadas por el antisero MDV. Correspondiente a la totalidad de cultivos de células DF-1 infectadas con rHVT-GFP. La relación de Pearson entre ambas determina el valor de  $r = 0.96$  con  $p = 0.011$  ( $p < 0.05$ ).

La correlación de Pearson no determina causalidad, pero si determina que el porcentaje de células AF647+, varía en función del porcentaje de células GFP+, en este caso de manera lineal. Determinando una relación positiva entre ambas. Es decir, el porcentaje de células detectadas producto de la unión de los anticuerpos policlonales del antisero MDV junto al anticuerpo anti-IgY unido a AF647, detecta valores similares a los porcentajes hallados por la expresión de la proteína GFP en células infectadas con rHVT-GFP.

#### IV.5. Detección de células DF-1 infectadas por diferentes MOI de HVT evaluadas en diferentes h.p.i.

Las células infectas fueron procesadas con el protocolo de detección a diferentes MOI (0.01 y 0.02 ) y h.p.i, con el fin de determinar el incremento en la detección

de células infectadas. El muestreo de las células comenzó pasadas las 24 horas de la infección, se continuó evaluando a intervalos de 24 horas (Figura 16).

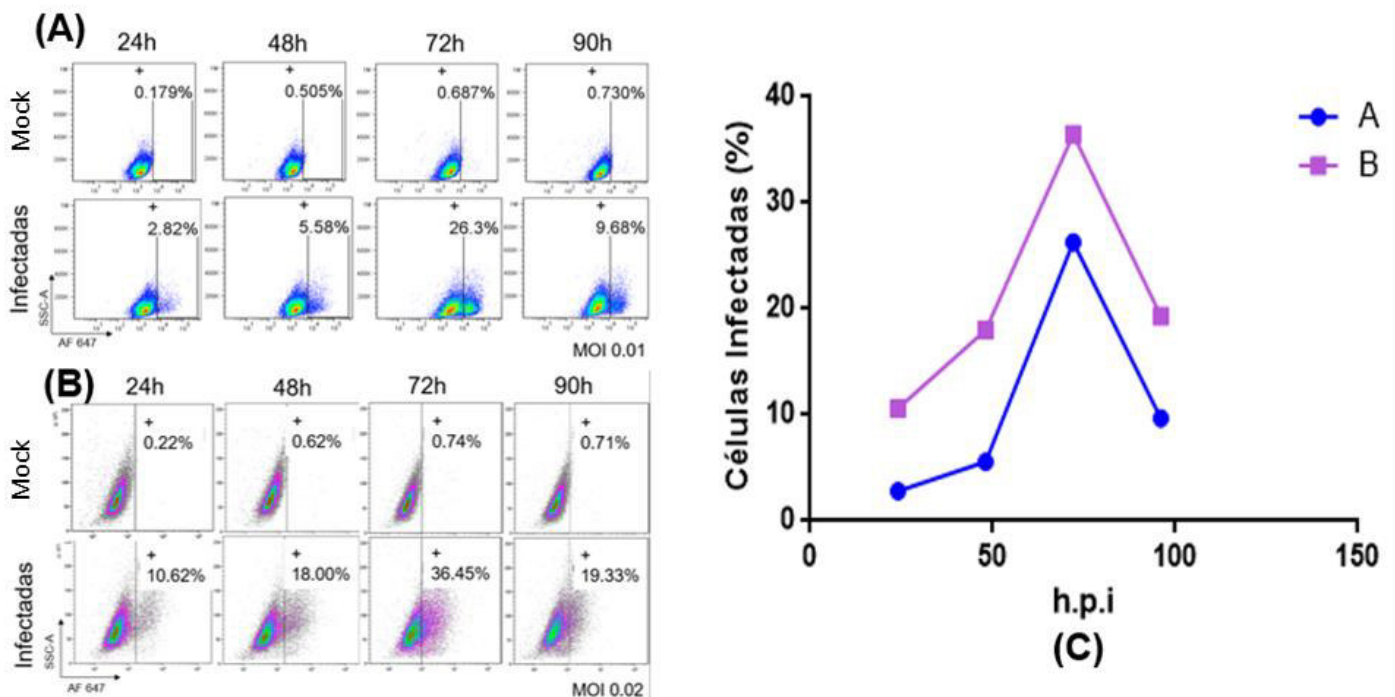


**Figura 16: Detección de células DF-1 infectadas por MOI de HVT evaluadas en diferentes h.p.i. (A) MOI 0.01 y (B) MOI 0.02 gráficas de puntos. Las células se cosecharon a las 24, 48, 72 y 96 h.p.i. Estas fueron procesadas con su respectivo control de marcación (Mock). (C) Curva de porcentaje de detección de células infectadas en el transcurso de h.p.i. para el MOI 0.01 y 0.02, azul y morado respectivamente.**

El incremento del porcentaje de células infectadas asegura que la cantidad de antisuero (anticuerpo primario) y anticuerpo secundario sean suficientes para detectar el incremento de células infectadas.

Conforme pasa el tiempo de infección podemos observar que tanto las células sanas como infectadas aumentan su auto fluorescencia. Sin embargo, esta sigue estando por debajo del 1% (Figura 16A y B).

El porcentaje de células infectadas para un MOI = 0.01 a las primeras 24 horas transcurridas se detecta un porcentaje de 2.82 %, duplicándose a las 48 horas con 5.58% de células infectadas, a las 72 horas las células infectadas alcanzaron

el 26.3% de células infectadas casi 5 veces el porcentaje anterior. Sin embargo, en el último horario analizado el porcentaje es 9.68%, para este punto la adquisición al citómetro fue de manera más lenta debido a los escasos de eventos en la muestra.

Así mismo el porcentaje de células infectadas para un MOI = 0.02 a las primeras 24 h.p.i. es de 10.68 %, a las 48 h.p.i. 18.0% de células infectadas, a las 72 horas las células infectadas alcanzaron el 36.45% de células infectadas, para las 96 h.p.i el porcentaje fue menor 19.33%. Se observa al comparar ambos MOI una mayor detección de células infectadas para el MOI de 0.02. Sin embargo, al intentar obtener una correlación directa entre ambos no se precisa, debido al comportamiento independiente de cada lote de cultivo analizado, ya sea MOI 0.01 ó 0.02.

## **VI. DISCUSIÓN**

Una gran cantidad de estudios describen la utilidad de la citometría a de flujo para detectar proteínas virales expresadas en células infectadas con virus patógenos atenuados o vectores virales mayormente en humanos como SV40, HCMV, HSV, HIV, MVA-BN, influenza virus, adenovirus, virus de sarampión entre otros (McSharry 2000, 1998; Li, 2009, Gueret *et al.*, 2002, Lonsdale *et al.* 2003, Schulze-Horsel *et al.*, 2008, Weaver 2000, Grigorov *et al.* 2011). Hasta el momento este procedimiento no se había adaptado para cepas virales importantes en industria veterinaria, como es HVT.

## **Formaldehído como fijador para la detección de células infectadas por citometría de flujo.**

La detección de HVT en células infectadas requirió de la construcción de un protocolo comenzando por la fijación y permeabilización de las células, en este punto, estudios anteriores evaluaron una gran variedad de agentes fijadores y permeabilizadores como formaldehído (Li, 2009; Weaver 2000, Grigorov *et al.* 2011) aplicado a diferentes tipos celulares, obteniendo un porcentaje de marcación inespecífica en las células control (células no infectadas marcadas) menor al 1%, mientras que publicaciones (McSharry, 2000; Schulze-Horsel *et al.*, 2008) que utilizan alcoholes (etanol y/o metanol) hallan una alta fluorescencia al marcar células sanas, por lo que optaron por utilizar, como control de marcación, a las células infectadas no marcadas. Esto no sucede al utilizar paraformaldehído como fijador pues tanto células sanas como células infectadas no marcadas poseen porcentajes de detección menores a 1% (Anexo 18).

Además, el uso de paraformaldehído mantuvo mejor el tamaño y la estructura celular (FSC vs SSC, Anexo 18) en comparación con las células DF-1 vivas, además de conferir baja autofluorescencia a los controles sanos marcados (SSC vs APC-A, Anexo 18), permitiendo el agrupamiento de las células infectadas.

## **Evaluación de diferentes permeabilizadores celulares para la detección de células infectadas por HVT.**

En tanto a la permeabilización, diversas publicaciones reportan en uso de Tween20 al 0.2%, (Li, 2009, Weaver 2000), teniendo como resultado una marcación inespecífica de entre 1 al 2%. Este reactivo sin embargo incrementa la autofluorescencia de las células (Mohd Suah *et al.* 2017). Esto concuerda con

la Figura 12C, donde el detergente Tritón X-100, incremento en 1 logaritmo la fluorescencia de las células en el eje AF488.

En las publicaciones revisadas donde mejor coeficiente de marcado (permite discernir mejor la población positiva de la negativa) es la fijación y permeabilización es el kit Cytotfix/Cytoperm BD (Lonsdale *et al.* 2003; Lambeth *et al.*, 2005, Hammarlun *et al* 2012) aplicable además para diversos virus. Sin embargo, entre los permeabilizadores revisados, el mejor resultado se obtuvo con el uso de saponina al 0.5%, empleando como fijador al formaldehído al 4% (Figura 9B).

Obteniendo un menor marcado inespecífico y una mayor cantidad de células infectadas detectadas. Esto debido a que el principal componente permeabilizante del Kit Cytotfix/Cytoperm BD es la saponina (Gerner *et al.*, 2008) la cual, a la concentración utilizada, demuestra ser efectiva para el tipo celular utilizado.

Guerner (2008) sintetiza, respecto a este tema, que no hay un protocolo de fijación y permeabilización ideal para todos los tipos celulares en la detección de antígenos intracelulares, este aspecto debe ser revisado para cada tipo celular evaluando el rendimiento de cada fijador y permeabilizador. Sin embargo, existe un factor común deseable, que es el mantenimiento de la forma celular durante el desarrollo del protocolo, hasta ser adquirida al citómetro.

## **Determinación del control de marcación para la detección de células infectadas por HVT**

El uso de células sanas marcadas es útil para determinar la cantidad de marcado inespecífico que puede aparecer por exceso de anticuerpo, de ahí la importancia de usar células sanas marcadas como control.

En otra publicación hacen uso de células infectadas no marcadas como control (Schulze-Horsel *et al.*, 2008), por lo cual la detección del marcado inespecífico por exceso de anticuerpo se debe determinar de otras maneras. En este trabajo se justifica el uso de este tipo de control debido a una subfluorescencia de las células sanas marcadas lo que indica una sobre estimación del porcentaje de células infectadas. Por nuestra parte hallamos dicha subfluorescencia en las “células infectadas no marcadas” (Anexo 18), esto debido a que este tipo de control no contempla la interferencia del antisuero MDV ni el anticuerpo secundario (AF647). Por estos motivos se determina el uso de células sanas marcadas como control de marcación, una vez definido esto fue posible dibujar el agrupamiento y determinar el porcentaje de células infectadas.

### **Titulación mediante la dilución del antisuero MDV.**

El uso de la cantidad adecuada de anticuerpo primario y secundario determina la especificidad de la prueba pues un exceso de uno de los dos anticuerpos o de ambos conlleva a una sobre estimación o subestimación del porcentaje de células infectadas.

La cantidad referenciada a usar para una marcación indirecta (uso de anticuerpo primario y secundario) es de 0.25  $\mu\text{g}$  (para cada uno) por cada millón de células a marcar (Weaver 2000). En este estudio, el anticuerpo secundario (anti IgY

producido en cabra asociado a Alexa flúor 647®) tiene un valor bastante menor (0.03 µg), esto puede ser debido a la eficiencia del fluoróforo, además de que este, encuentra disponible una cantidad suficiente de antisuero MDV a la cual adherirse.

La cantidad óptima de antisuero MDV fue determinado por una serie de diluciones. La dilución 1/3200 (Figura 13), aseguró una detección con la menor inespecificidad (células sanas marcadas) y la mayor detección (células infectadas marcadas). Este suero comercial (Charles River) no ofrece una concentración en mg/ml de los anticuerpos específicos, pero si garantizan su especificidad a MDV (Anexo 4).

Ambos reactivos no mostraron ninguna deficiencia en la cantidad y calidad necesarios para detectar el incremento de células infectadas a diversas horas post infección (Figura 13).

#### **Especificidad del antisuero MDV y NDV (Charles River) para la detección de células infectadas con HVT.**

El uso de anticuerpos para la detección de los antígenos intracelulares en células infectadas suele ser de tipo monoclonal (Gervais *et al.*, 1997, McSharry 2000; Weaver 2000; Lambeth *et al.*, 2005; Drayman y Oppenheim 2010; Grigorov *et al.* 2011), sin embargo, el uso de anticuerpos policlonales no se queda atrás (Li, 2009; Steele-Mortimer *et al.*, 2001). Tanto anticuerpos monoclonales como policlonales se han usado para la detección precisa de antígeno viral, la mayor parte de estas publicaciones busca titular el virus y determinar cuantitativamente la dinámica de la infección por lo que utilizan anticuerpos monoclonales para proteínas de expresión temprana en la replicación viral.

Weaver (2000), analiza esto al usar dos anticuerpos de expresión temprana e intermedia, y otro anticuerpo monoclonal para una proteína de expresión tardía. Esto para controlar en tiempos más largos la correcta producción de determinado virus. En otra publicación se reporta el uso de una combinación de dos anticuerpos monoclonales para monitorear la producción de cepas vacúnales de virus de influenza (Schulze-Horsel *et al.*, 2008).

Debido a la falta de anticuerpos monoclonales accesibles para HVT, se decidió usar el antisuero MDV (Charles River) producido en animales SPF con el fin de garantizar que los anticuerpos solo reconozcan al patógeno MDV (control de calidad - Anexo 4). Este antisuero al contener anticuerpos que reconocen a varios antígenos de MDV (muy semejante antigénicamente a HVT) tanto de expresión temprana y tardía, permite dar seguimiento a todo el proceso infectivo, hasta que la infección decae. Para corroborar esto de manera experimental se usó otro suero de la misma marca, pero para diferente patógeno (NDV) (Anexo 5), donde no se obtuvo marcado inespecífico para ninguna hora post infección analizada (Figura 11).

### **Correlación entre la detección de células infectadas por rHVT-GPF, mediante el protocolo desarrollado y GFP.**

La detección y titulación de virus por citometría de flujo haciendo uso de GFP fue descrita con anterioridad, obteniendo una correlación alta entre los valores determinados por GFP y el ensayo de placa, considerado “Gold Estándar” en la titulación de virus (Gervaix *et al.*, 1997; McSharry, 2000; Gueret *et al.*, 2002; Li y Schat, 2004; Grigorov *et al.*, 2011). Así la marcación de otro antígeno expresado intracelularmente por el virus fue marcada por el antisuero MDV y un anticuerpo fluorescente (AF647), detectando las células infectadas que a su vez expresan

GFP (Figura 15). Esto asegura que se detecte con el protocolo desarrollado, un porcentaje semejante al porcentaje de células infectadas que expresan GFP. Al comparar ambos valores se encuentra una alta correlación entre ambos porcentajes detectados por citometría de flujo. Esto es apreciable en la Figura 15C, al comparar los valores obtenidos para GFP y AF647 (Anexo 19).

En Grigorov y colaboradores (2011) se expresa que las partículas virales defectivas no son consideradas en la detección de células infectadas pues no tienen la capacidad de ser endocitadas y replicarse en el interior de la célula. Esto determina que solo aquellas partículas virales infectivas son detectadas. En el caso de HVT estas se caracterizan por contener la mayor parte del virus producido por la maquinaria celular secuestrada en el interior de las células. Esta característica explicaría, por qué los porcentajes de células infectadas detectadas por GFP y por el antisuero, no solo poseen una correlación lineal, significativa ( $p$  menor a 0.05) sino que también son porcentajes bastante cercanos. Al ser GFP una proteína citosólica (McGregor et al., 2013), el porcentaje de células detectadas obtenido será comparable al detectado al usar el antisuero MDV al cual mediante el protocolo aplicado, tiene acceso a los antígenos intracelulares.

### **Detección del incremento de células DF-1 infectadas por diferentes MOI de HVT evaluadas en diferentes h.p.i.**

El incremento de células infectadas fue determinado en células infectadas por diferentes MOI a diferentes h.p.i (Schulze-Horsel *et al.*, 2008; Weaver, 2000; Gueret *et al.*, 2002), aunque también podría realizarse al infectar células con diferentes diluciones de virus (Lambeth *et al.*, 2005; Grigorov *et al.*, 2011). Obteniendo así una curva con la cantidad de células infectadas detectadas en

relación con la cantidad viral utilizada, o varias curvas si cada MOI o dilución utilizada es evaluada en tiempo.

Para cada virus y tipo celular permisivo o adaptado donde se realice la expansión del virus, el valor obtenido variará de acuerdo con la cinética inherente a cada virus y célula utilizada. Así la cantidad de células infectadas detectadas puede variar de acuerdo con el tiempo y el efecto citopático que produzca el virus al lisar las células (Dilnessa y Zeleke, 2017)

Lambeth (2005), reporta porcentajes de células infectadas, detectadas a través del tiempo tanto en horas como días post infección, determinando horarios donde el porcentaje detectado disminuye a raíz de la segunda ronda de infecciones, esto no es apreciable en los resultados debido a los intervalos de 24 horas tomados. Por lo que para evaluaciones de cinética se recomienda una toma de muestra en intervalos más cortos.

En nuestro caso se logró apreciar en la figura 16, una mayor cantidad de células infectadas a las 72 h.p.i. y se identificó a las 96 h.p.i un decaimiento de la mayor parte de estas células infectadas, en este punto de tiempo, se observó también una gran cantidad de células muertas al momento de realizar el conteo post subcultivo. Ambos datos podrían indicar que a las 96 h.p.i. se halla la muerte de gran parte de las células y podría ser posible encontrar virus en el sobredanadante.

El tipo de curva obtenido (Figura 16C) delata una dinámica de infección ampliamente reportado en la detección de células infectadas por virus mediante citometría de flujo (Gueret *et al.*, 2002; Lambeth *et al.*, 2005; Gates *et al.*, 2009; Logan *et al.*, 2019).

El efecto citopático generado por el virus y el desgaste de las células en cultivo puede incrementar la autofluorescencia de las células (Dilnessa y Zeleke, 2017), generando falsos positivos. Para el protocolo aquí aplicado este efecto se puede visualizar en la Figura 17, sin embargo, este incremento de la fluorescencia fue mínimo sin sobrepasar el 1% de señal falsa positiva.

El protocolo de detección de células infectadas mediante citometría de flujo permite dar seguimiento al proceso de producción de cepas virales de HVT en cultivo celular en apenas 5 horas. Su alta correlación con el monitoreo de cultivos por GFP, determina un valor confiable propicio para estandarizar protocolos de cultivo y detectar diferencias en los lotes durante su producción. La citometría de flujo representa una herramienta valiosa para investigar la influencia de las condiciones de cultivo celular en el proceso de replicación y el rendimiento en la producción de cepas virales de HVT.

## VII. CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos indican que, el protocolo desarrollado detecta el porcentaje de células infectadas presentes en la muestra, mediante citometría de flujo.
2. Se determinó como óptimo para la detección de células infectadas con HVT, al protocolo *in house* que tiene como permeabilizador celular al detergente saponina 0.5%. Este detecta el mayor porcentaje de células infectadas y conserva la morfología de las células infectadas.
3. El título del antisuero MDV, fue de 1/3200. Con un bajo registro de inespecificidad y una mayor detección de células infectadas con HVT. El antisuero MDV es específico para marcar al antígeno HVT. El antisuero NDV no detecta inespecificidades.
4. Se detecta una correlación fuerte de Pearson entre el porcentaje de células infectadas detectadas por el protocolo desarrollado (figura 8) y las detectadas por GFP, en las células infectadas por rHVT-GFP.
5. Mediante el uso del protocolo desarrollado se logró detectar el incremento de las células infectadas por los MOI 0.01 y 0.02; también se logró detectar el incremento de la infección al ser evaluadas a las 24, 48, 72 y 96 h.p.i.

## **VIII. RECOMENDACIONES**

1. Determinar la especificidad del antisuero MDV con el virus IBDV.
2. Realizar el seguimiento de la infección de HVT en intervalos de h.p.i. más cortos, a fin de comprender mejor la dinámica de la infección de HVT en DF-1.
3. Utilizar este protocolo para llevar a cabo la titulación por citometría de flujo de diversas cepas de HVT y cualquiera de sus recombinantes.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2016). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews In Biotechnology*, 37(2), 163-176. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876>
- Afonso, C., Tulman, E., Lu, Z., Zsak, L., Rock, D., & Kutish, G. (2001). The Genome of Turkey Herpesvirus. *Journal Of Virology*, 75(2), 971-978. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.2.971-978.2001>
- Atkins, K., Read, A., Savill, N., Renz, K., Walkden-Brown, S., & Woolhouse, M. (2011). Modelling Marek's Disease Virus (MDV) infection: parameter estimates for mortality rate and infectiousness. *BMC Veterinary Research*, 7(1), 70. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-7-70>
- Avian Antigens & Antisera | Charles River. (2020). Extraïda el 2 January 2020, de <https://www.criver.com/products-services/avian-vaccine-services/avian-antigens-and-antisera?region=3601>
- Bdbiosciences.com. 2021. BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeablization Kit. [online] Available at: <<https://www.bdbiosciences.com/en-us/products/reagents/flow-cytometry-reagents/research-reagents/buffers-and-supporting-reagents-ruo/bd-cytofix-cytoperm-fixation-permeablization-kit.554714>> [Accessed 24 June 2021].
- Boodhoo, N., Gurung, A., Sharif, S., & Behboudi, S. (2016). Marek's disease in chickens: a review with focus on immunology. *Veterinary Research*, 47(1). <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0404-3>

- Burrell, C. J., Howard, C. R., & Murphy, F. A. (2017). Laboratory Diagnosis of Virus Diseases. Fenner and White's Medical Virology, 135–154.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375156-0.00010-2>
- Calnek, B. (2001). Pathogenesis of Marek's Disease Virus Infection. *Current Topics In Microbiology And Immunology*, 25-55.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-642-56863-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-56863-3_2)
- Charlton, B., & Bermudez, A. (2006). Avian disease manual. American Association of Avian Pathologists. Online version.
- Cronenberg, A.M., van Geffen, C.E., Dorrestein, J., Vermeulen AN, Sondermeijer PJ. (1999). Vaccination of broilers with HVT expressing an Eimeria acervulina antigen improves performance after challenge with Eimeria. *Acta Virol.* 43, 192.
- Collins, A.M.y Donoghue A.M. (1999) Viability assessment of honey bee (*Apis mellifera*) sperm using dual fluorescent staining, *Theriogenology* 51, 1513–1523.
- Coons, A., Creech, H., & Jones, R. (1941). Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group. *Experimental Biology and Medicine*, 47(2), 200-202. doi: 10.3181/00379727-47-13084p.
- Darteil, R., Bublot, M., Laplace, E., Bouquet, J., Audonnet, J., & Rivière, M. (1995). Herpesvirus of Turkey Recombinant Viruses Expressing Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) VP2 Immunogen Induce Protection against an IBDV Virulent Challenge in Chickens. *Virology*, 211(2), 481-490.  
<https://doi.org/10.1006/viro.1995.1430>

- Debnath, M., Prasad, G., & Bisen, P. (2009). Reporter Gene. *Molecular Diagnostics: Promises And Possibilities*, 71-84. doi: 10.1007/978-90-481-3261-4\_5
- Dilnessa, T., & Zeleke, H. (2017). Cell Culture, Cytopathic Effect and Immunofluorescence Diagnosis of Viral Infection.
- Drayman, N., & Oppenheim, A. (2011). Rapid titration of viruses by flow cytometry. *Current protocols in cell biology*, 51(1), 26-11.
- Franco, Alicia Y., & Longart, Marínés (2009). Aplicaciones de la proteína verde fluorescente (GFP) en la biología celular y en la visualización del sistema nervioso. *RET. Revista de Estudios Transdisciplinarios*, 1(2),84-96.[fecha de Consulta 27 de Octubre de 2021]. ISSN: 1856-9161. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179214945007>
- Gerner, W., Käser, T., Pintarič, M., GroiB, S., & Saalmüller, A. (2008). Detection of intracellular antigens in porcine PBMC by flow cytometry: A comparison of fixation and permeabilisation reagents. *Veterinary Immunology And Immunopathology*, 121(3-4), 251-259. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.09.019>
- Gervaix, A., West, D., Leoni, L., Richman, D., Wong-Staal, F., & Corbeil, J. (1997). A new reporter cell line to monitor HIV infection and drug susceptibility in vitro. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 94(9), 4653-4658. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.9.4653>

- Giloh, H. (1993). Analysis of Intracellular Antigens by Flow Cytometry: Methods for Cell Permeabilization to Antibodies. *Flow Cytometry*, 65-101. doi: 10.1007/978-3-642-84616-8\_5
- Grigorov, B., Rabilloud, J., Lawrence, P., & Gerlier, D. (2011). Rapid Titration of Measles and Other Viruses: Optimization with Determination of Replication Cycle Length. *Plos ONE*, 6(9), e24135. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024135>
- Gimeno, I. (2008). Marek's disease vaccines: A solution for today but a worry for tomorrow?. *Vaccine*, 26, C31-C41. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.04.009
- Gimeno, I., Cortes, A., Faiz, N., Villalobos, T., Badillo, H., & Barbosa, T. (2016). Efficacy of Various HVT Vaccines (Conventional and Recombinant) Against Marek's Disease in Broiler Chickens: Effect of Dose and Age of Vaccination. *Avian Diseases*, 60(3), 662-668. doi: 10.1637/11415-040116-reg.1
- Goldenthal, K., Hedman, K., Chen, J., August, J., & Willingham, M. (1985). Postfixation detergent treatment for immunofluorescence suppresses localization of some integral membrane proteins. *Journal Of Histochemistry & Cytochemistry*, 33(8), 813-820. <https://doi.org/10.1177/33.8.3894499>
- Goding, J. (1996). Immunofluorescence. *Monoclonal Antibodies*, 352-399. doi: 10.1016/b978-012287023-1/50060-2
- Gueret, V., Negrete-Virgen, J. A., Lyddiatt, A., & Al-Rubeai, M. (2002). Rapid titration of adenoviral infectivity by flow cytometry in batch culture of

infected HEK293 cells. *Cytotechnology*, 38(1-3), 87-97.  
10.1023/A:1021106116887

Hammarlund, E., Amanna, I., Dubois, M., Barron, A., Engelmann, F., Messaoudi, I., & Slifka, M. (2012). A Flow Cytometry-Based Assay for Quantifying Non-Plaque Forming Strains of Yellow Fever Virus. *Plos ONE*, 7(9), e41707.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041707>

Hobro, A., & Smith, N. (2017). An evaluation of fixation methods: Spatial and compositional cellular changes observed by Raman imaging. *Vibrational Spectroscopy*, 91, 31-45. doi: 10.1016/j.vibspec.2016.10.012

Hoeksema, F., Karpilow, J., Luitjens, A., Lagerwerf, F., Havenga, M., & Groothuizen, M. et al. (2018). Enhancing viral vaccine production using engineered knockout vero cell lines – A second look. *Vaccine*, 36(16), 2093-2103. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.03.010>

Hughes, A., & Rivailler, P. (2007). Phylogeny and recombination history of gallid herpesvirus 2 (Marek's disease virus) genomes. *Virus Research*, 130(1-2), 28-33. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.05.008>

McGregor, A., Choi, K., Schachtele, S., & Lokensgard, J. (2013). Human Herpesviruses and Animal Models. *Animal Models For The Study Of Human Disease*, 905-925. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-415894-8.00037-3>

Jaikumar, D., Read, K., & Tannock, G. (2001). Adaptation of Marek's disease virus to the Vero continuous cell line. *Veterinary Microbiology*, 79(1), 75-82. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(00\)00346-1](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(00)00346-1)

- Jamur, M., & Oliver, C. (2009). Permeabilization of Cell Membranes. *Immunocytochemical Methods And Protocols*, 63-66. doi: 10.1007/978-1-59745-324-0\_9
- Jang, J. (2011). Validation of a Real-Time RT-PCR Method to Quantify Newcastle Disease Virus (NDV) Titer and Comparison with Other Quantifiable Methods. *Journal Of Microbiology And Biotechnology*, 21(1), 100-108. <https://doi.org/10.4014/jmb.1006.06006>
- Kalbfuss, B., Knöchlein, A., Kröber, T., & Reichl, U. (2008). Monitoring influenza virus content in vaccine production: Precise assays for the quantitation of hemagglutination and neuraminidase activity. *Biologicals*, 36(3), 145-161. doi: 10.1016/j.biologicals.2007.10.002
- Kao, C., Wu, M., Chiu, Y., Lin, J., Wu, Y., Yueh, Y., Chen, L., Shaio, M. and King, C. (2001). Flow Cytometry Compared with Indirect Immunofluorescence for Rapid Detection of Dengue Virus Type 1 after Amplification in Tissue Culture. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(10), pp.3672-3677.
- Kim, H., You, S., Kim, I., Farris, J., Foster, L., & Foster, D. (2001). Increased Mitochondrial-Encoded Gene Transcription in Immortal DF-1 Cells. *Experimental Cell Research*, 265(2), 339-347. <https://doi.org/10.1006/excr.2001.5207>
- Liu, L., Wang, T., Wang, M., Tong, Q., Sun, Y., Pu, J., Sun, H. and Liu, J. (2019). Recombinant turkey herpesvirus expressing H9 hemagglutinin providing protection against H9N2 avian influenza. *Virology*, 529, pp.7-15.

- Lambeth, C. R., White, L. J., Johnston, R. E., & De Silva, A. M. (2005). Flow cytometry-based assay for titrating dengue virus. *Journal of clinical microbiology*, 43(7), 3267-3272.
- Li, X., & Schat, K. (2004). Quail Cell Lines Supporting Replication of Marek's Disease Virus Serotype 1 and 2 and Herpesvirus of Turkeys. *Avian Diseases*, 48(4), 803-812. <https://doi.org/10.1637/7182-032604r>
- Lonsdale, R., Pau, M. G., Oerlemans, M., Ophorst, C., Vooys, A., Havenga, M., Marzio, G. (2003). A rapid method for immunotitration of influenza viruses using flow cytometry. *Journal of Virological Methods*, 110(1), 67–71. doi:10.1016/s0166-0934(03)00102-2
- Logan, M., Manalil, J., Notte, C., Kearse, C., George, S., Zeiser, A., Farrell, P. and Aucoin, M. (2019). A flow cytometric granularity assay for the quantification of infectious virus. *Vaccine*, 37(47), pp.7090-7099.
- Macey MG. (2010). Principles of flow cytometry. *Flow cytometry: principles and applications* In: Macey MG, ed. Totowa (NJ): Humana Press, 1–15.
- McGregor, A., Choi, K., Schachtele, S., & Lokensgard, J. (2013). Human Herpesviruses and Animal Models. *Animal Models For The Study Of Human Disease*, 905-925. doi: 10.1016/b978-0-12-415894-8.00037-3
- McSharry, J. (2000). Analysis of Virus-Infected Cells by Flow Cytometry. *Methods*, 21(3), 249-257. <https://doi.org/10.1006/meth.2000.1005>
- Mohd Suah, F., Musa, A. and Mehamod, F. (2017). EFFECT OF NON-IONIC SURFACTANTS TO THE Al(III)-MORIN COMPLEX AND ITS

APPLICATION IN DETERMINATION OF Al(III) IONS: A PRELIMINARY STUDY. *Malaysian Journal of Analytical Science*, 21(4).

- Nayak, D., & Reichl, U. (2004). Neuraminidase activity assays for monitoring MDCK cell culture derived influenza virus. *Journal Of Virological Methods*, 122(1), 9-15. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.07.005>
- Nordstrom, T., Willamo, P., Arvela, M., Stenroos, K., & Lindqvist, C. (1999). Detection of baculovirus-infected insect cells by flow cytometric side-scatter analyses. *Cytometry*, 37(3), 238-242. doi: 10.1002/(sici)1097-0320(19991101)37:3<238::aid-cyto11>3.0.co;2-9
- Prasher, D., Eckenrode, V., Ward, W., Prendergast, F., & Cormier, M. (1992). Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene*, 111(2), 229-233. doi: 10.1016/0378-1119(92)90691-h
- Rai, S., Bhardwaj, U., Misra, A., Singh, S., & Gupta, R. (2018). Comparison between photostability of Alexa Fluor 448 and Alexa Fluor 647 with conventional dyes FITC and APC by flow cytometry. *International Journal Of Laboratory Hematology*, 40(3), e52-e54. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12809>
- Reddy, S. (1996). Antigen-specific lymphoproliferative responses to tetanus toxoid: a means for the evaluation of Marek's disease virus-induced immunosuppression in chickens. *Vaccine*, 14(17-18), 1695-1702. doi: 10.1016/s0264-410x(96)00067-9
- Rekha, K., Sivasubramanian, C., Chung, I., & Thiruvengadam, M. (2014). Growth and Replication of Infectious Bursal Disease Virus in the DF-1 Cell Line

- and Chicken Embryo Fibroblasts. *Biomed Research International*, 2014, 1-6. <https://doi.org/10.1155/2014/494835>
- Romanova, J. (2017). Influenza vaccines manufacturing in continuous cell lines: problems and solutions. *Microbiology Independent Research*, 4(1), 1-9. doi: 10.18527/2500-2236-2017-4-1-1-9
- Rong, S., Wheeler, D., & Weber, F. (2014). Efficient Marek's disease virus (MDV) and herpesvirus of turkey infection of the QM7 cell line that does not contain latent MDV genome. *Avian Pathology*, 43(5), 414-419. <https://doi.org/10.1080/03079457.2014.956687>
- Sadigh, Y., Powers, C., Spiro, S., Pedrera, M., Broadbent, A., & Nair, V. (2018). *Gallid herpesvirus 3* SB-1 strain as a recombinant viral vector for poultry vaccination. *npj Vaccines*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/s41541-018-0056-6>
- Souza, A., Haut, L., Reyes-Sandoval, A., & Pinto, A. (2005). Recombinant viruses as vaccines against viral diseases. *Brazilian Journal Of Medical And Biological Research*, 38(4), 509-522. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2005000400004>
- Shah, N., & Ershler, W. (2007). Immune System. *Encyclopedia Of Gerontology*, 742-749. <https://doi.org/10.1016/b0-12-370870-2/00097-4>
- Shapiro HM. (2004). Lasers for flow cytometry. *Curr Protoc Cytom*, 49, 1.1.9–1.1.17.

- Seeman, P., Cheng, D., & Iles, G. (1973). STRUCTURE OF MEMBRANE HOLES IN OSMOTIC AND SAPONIN HEMOLYSIS. *Journal Of Cell Biology*, 56(2), 519-527. <https://doi.org/10.1083/jcb.56.2.519>
- Schmid, I., Uittenbogaart, C., & Giorgi, J. (1991). A gentle fixation and permeabilization method for combined cell surface and intracellular staining with improved precision in DNA quantification. *Cytometry*, 12(3), 279-285. <https://doi.org/10.1002/cyto.990120312>
- Schat, K. (2016). History of the First-Generation Marek's Disease Vaccines: The Science and Little-Known Facts. *Avian Diseases*, 60(4), 715. doi: 10.1637/11429-050216-hist
- Shimomura, O., Johnson, F., & Saiga, Y. (1962). Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea. *Journal Of Cellular And Comparative Physiology*, 59(3), 223-239. doi: 10.1002/jcp.1030590302
- Swayne, D. (2009). Avian influenza vaccines and therapies for poultry. *Comparative Immunology, Microbiology And Infectious Diseases*, 32(4), 351-363. doi: 10.1016/j.cimid.2008.01.006
- Swayne, D. (2011). Diseases of poultry. 12th ed. Iowa State University Press: Y. M. Saif.
- Sondermeijer, P.J., Claessens, J.A., Jenniskens, P.E., et al., (1993). Avian herpesvirus as a live viral vector for the expression of heterologous antigens. *Vaccine* 11, 349–358.

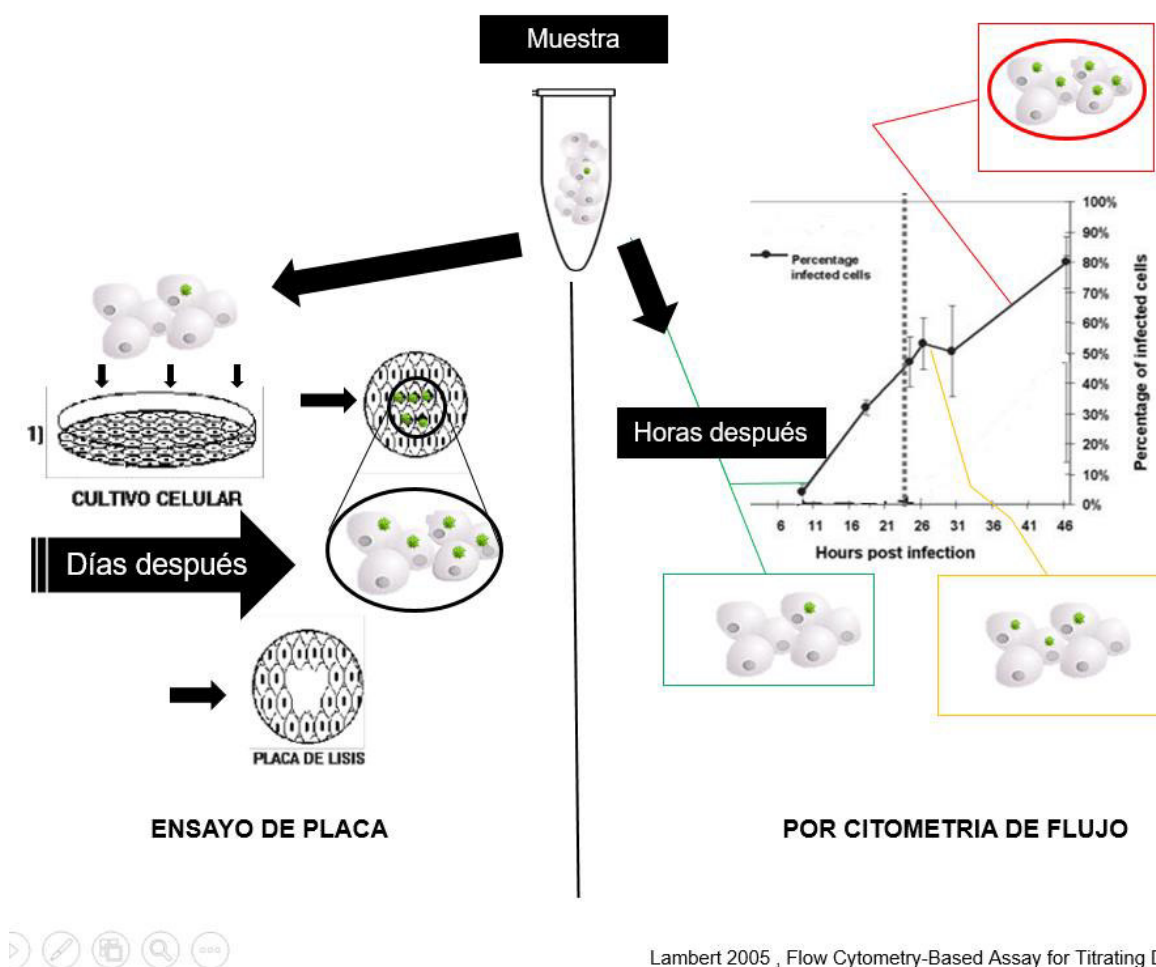
- Schulze-Horsel, J., Genzel, Y., & Reichl, U. (2008). Flow cytometric monitoring of influenza A virus infection in MDCK cells during vaccine production. *BMC Biotechnology*, 8(1), 45. doi: 10.1186/1472-6750-8-45
- Tang, N., Zhang, Y., Pedrera, M., Chang, P., Baigent, S., & Moffat, K. et al. (2019). Generating Recombinant Avian Herpesvirus Vectors with CRISPR/Cas9 Gene Editing. *Journal Of Visualized Experiments*, (143). <https://doi.org/10.3791/58193>
- Thanavala, Y. (1998). Antiserum. *Encyclopedia Of Immunology*, 218-220. doi: 10.1006/rwei.1999.0058
- Torres, A., Marin, S., Costa, C., & Martins, N. (2019). An Overview on Marek's Disease Virus Evolution and Evidence for Increased Virulence in Brazil. *Brazilian Journal Of Poultry Science*, 21(1). doi: 10.1590/1806-9061-2018-0870
- UMNSAH/DF-1 ATCC ® CRL-12203™ Gallus gallus embryo. (2020). Retrieved 10 February 2020, from <https://www.atcc.org/Products/All/CRL-12203.aspx#culturemethod>
- Vira, S., Mekhedov, E., Humphrey, G., & Blank, P. (2010). Fluorescent-labeled antibodies: Balancing functionality and degree of labeling. *Analytical Biochemistry*, 402(2), 146-150. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.03.036>
- Wilkerson MJ. (2012). Principles and applications of flow cytometry and cell sorting in companion animal medicine. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 42, 53–71.

Witter, R. (1997). Increased Virulence of Marek's Disease Virus Field Isolates. *Avian Diseases*, 41(1), 149. doi: 10.2307/1592455

Wlodkowic, D., Telford, W., Skommer, J., & Darzynkiewicz, Z. (2011). Apoptosis and Beyond: Cytometry in Studies of Programmed Cell Death. *Methods In Cell Biology*, 55-98. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-385493-3.00004-8>

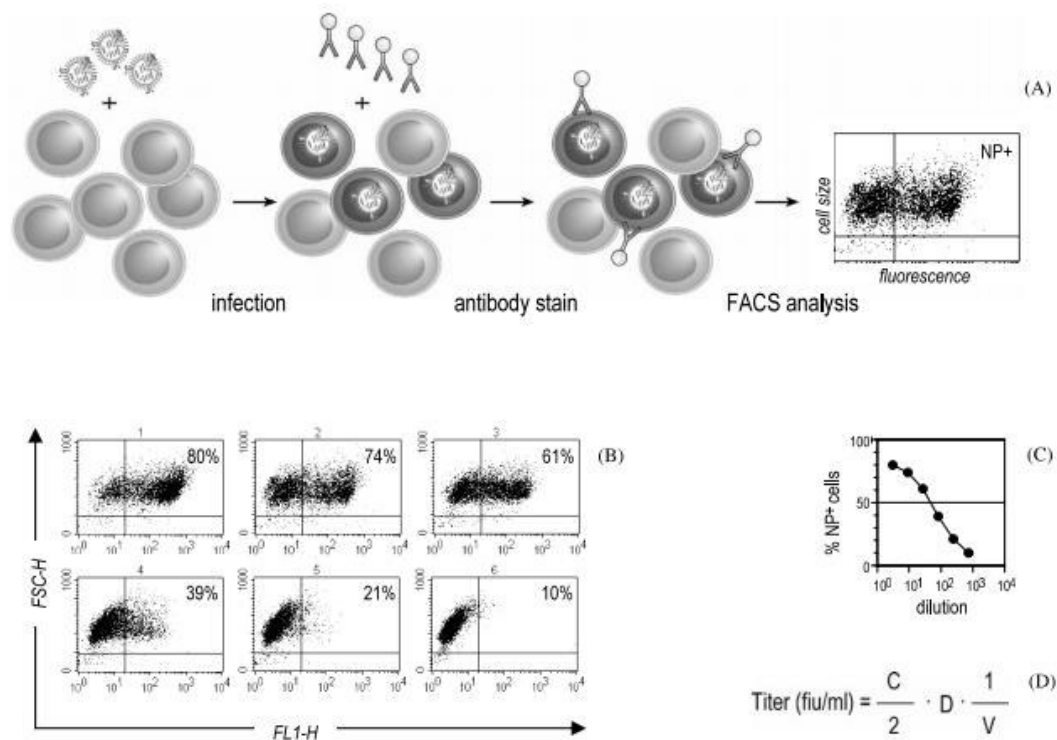
## X. ANEXOS

**ANEXO 1.** Esquema del procedimiento de detección de células infectadas por citometría de flujo y ensayo de placa. Comparación del tiempo utilizado para obtener resultado en ambas técnicas. La técnica por citometría de flujo puede determinar el número de células infectadas y el incremento de la infección. El gráfico fue construido teniendo en base lo expresado en Lambeth (2005).

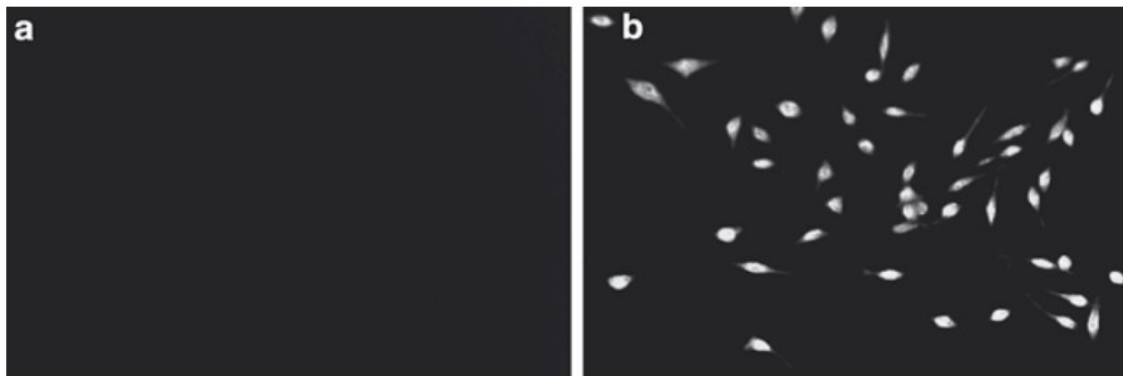


Lambert 2005 , Flow Cytometry-Based Assay for Titrating Dengue Virus

**ANEXO 2.** Detección y titulación por FACS del virus de influenza en células PER.C6 (Lonsdale *et al.*, 2003). (A) Representación esquemática del procedimiento. (B) Gráficos FACS resultantes de la infección de PER.C6 con diluciones víricas seriadas (gráfico 1/6). El cuadrante superior derecho de cada gráfico representa el NP (C) Se representa gráficamente el número de células infectadas (porcentaje) frente a las diluciones utilizadas. Se calcula la dilución que infecta al 50% de las células.



**ANEXO 3.** Permeabilización de células para marcar moléculas internas (Jamur & Oliver, 2009). Células RBL-2H3 cultivadas no permeabilizadas (a) y permeabilizadas con acetona (b) durante 5 min a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Sin permeabilización, no hay inmunotinción. Sin embargo, después de la permeabilización, el anticuerpo tiene acceso al antígeno y al inmunomarcador de las células.



**Anexo 4.** Certificado de análisis del antisuero aviar para la enfermedad de Marek (MDV) de la casa comercial "Charles River". Con altos niveles de actividad neutralizante y probados para la aplicación como inmunodifusión, inhibición de la hemaglutinación (HI) e inmunotransferencia. El análisis incluye más de 40 pruebas la cual confirma la especificidad (*Avian Antigens & Antisera* | Charles River, 2021).



## CERTIFICATE OF ANALYSIS

### Marek's Disease Antiserum/Inactivated (NOT FOR HUMAN CONSUMPTION)

**MATERIAL NUMBER:** 10100474 Lyophilized **BATCH NUMBER:** D0116  
10100627 Liquid

**DESCRIPTION OF PRODUCT:** Filter-sterilized serum prepared in specific pathogen free chickens.

**FORM AND AMOUNT:** 1 ml quantities

**PURITY:** Antiserum is mono-specific for the agent indicated and is serologically negative for all other common poultry pathogens.

**STABILIZERS/PRESERVATIVES ADDED:** None

**STORAGE CONDITIONS:** Store lyophilized/liquid product at -20 C. Reconstitute with 1 ml of sterile deionized or distilled water. After reconstituting, store at -20 C. May be freeze thawed repeatedly.

**INACTIVATION METHOD:** Heat inactivated at 56 C for 30 minutes.

**CAUTIONS OR HAZARDS:** Product is non-hazardous to humans.  
Non-Infectious to poultry species.

**EXPIRATION DATE/SHELF LIFE:** ..... 30-Sep-2021

**COUNTRY OF ORIGIN:** USA

*Judith Sanchez*  
**Judith Sanchez – Customer  
Service Representative**

### MAREK'S DISEASE ANTISERUM

(Chicken Origin)  
Heat Inactivated

Lot No. D0116  
Expiration 09/21

|                                  |       |          |  | Neutralizing Indices            |            |                   |
|----------------------------------|-------|----------|--|---------------------------------|------------|-------------------|
| Infectious Bronchitis Ark        | HI    | Negative |  | Infectious Bursal Disease       | SN         | 10 <sup>1.0</sup> |
| Infectious Bronchitis Mass       | HI    | Negative |  | Infectious Laryngotracheitis    | SN         | 10 <sup>0.0</sup> |
| Infectious Bronchitis Conn       | HI    | Negative |  | Av. Encephalomyelitis           | SN         | 10 <sup>0.8</sup> |
| Infectious Bronchitis JMK        | HI    | Negative |  | Infectious Bronchitis Ark       | SN         | 10 <sup>1.0</sup> |
| Infectious Bronchitis DE-072     | HI    | Negative |  | Infectious Bronchitis Conn      | SN         | 10 <sup>1.8</sup> |
| Newcastle Disease                | HI    | Negative |  | Infectious Bronchitis JMK       | SN         | 10 <sup>1.4</sup> |
| Paramyxovirus Type 2             | HI    | Negative |  | Infectious Bronchitis Mass      | SN         | 10 <sup>0.3</sup> |
| Paramyxovirus Type 3             | HI    | Negative |  |                                 |            |                   |
| Avian Influenza Type A           | HI    | Negative |  | <b>Marek's Disease</b>          | <b>AGP</b> | <b>Positive</b>   |
| Avian Adenovirus Group III (EDS) | HI    | Negative |  | Inf. Bursal Disease             | AGP        | Negative          |
|                                  |       |          |  | Av. Adenovirus Grp II (HEV)     | AGP        | Negative          |
| Avian Nephritis Virus            | MFIA  | Negative |  | Avian Adenovirus                | AGP        | Negative          |
| Inf. Bursal Disease              | MFIA  | Negative |  | Av. Encephalomyelitis           | AGP        | Negative          |
| Av. Adenovirus Grp II (HEV)      | MFIA  | Negative |  | Fowl Pox                        | AGP        | Negative          |
| Avian Reovirus                   | MFIA  | Negative |  | Av. Influenza A                 | AGP        | Negative          |
| Newcastle Disease                | MFIA  | Negative |  | Inf. Laryngotracheitis          | AGP        | Negative          |
| Av. Encephalomyelitis            | MFIA  | Negative |  | Newcastle Disease               | AGP        | Negative          |
| Infectious Bronchitis            | MFIA  | Negative |  | Avian Reovirus                  | AGP        | Negative          |
| Paramyxovirus Type 2             | MFIA  | Negative |  | Reticuloendotheliosis           | AGP        | Negative          |
| Fowl Pox                         | MFIA  | Negative |  | Av. Rotavirus                   | AGP        | Negative          |
| Avian Lymphoid Leukosis (A,B,J)  | MFIA  | Negative |  |                                 |            |                   |
| Inf. Influenza A                 | MFIA  | Negative |  | Chick Anemia Virus              | IFA        | Negative          |
| Infectious Laryngotracheitis     | MFIA  | Negative |  | Avian Nephritis Virus           | IFA        | Negative          |
|                                  |       |          |  | Avian Reovirus                  | IFA        | Negative          |
| Mycoplasma gallisepticum         | SPA   | Negative |  | Av. Reticuloendotheliosis       | IFA        | Negative          |
| Mycoplasma synoviae              | SPA   | Negative |  |                                 |            |                   |
| Salmonella pullorum-gallinarum   | SPA   | Negative |  |                                 |            |                   |
|                                  |       |          |  | Avian Reovirus                  | MNT        | Negative          |
| Avian Rhinotracheitis Virus      | ELISA | Negative |  | Av. Adenovirus Group I (I-XII)  | MNT        | Negative          |
| Avian Lymphoid Leukosis (Virus)  | ELISA | Negative |  | Avian Lymphoid Leukosis (A,B,J) | MNT        | Negative          |

*Theodore Girshick* 09/14/16  
Theodore Girshick, Ph.D. Date  
Director of Laboratory Operations  
Charles River Avian Vaccine Services

*Harold May* 14 Sep 20  
Quality Assurance Date  
Charles River Avian Vaccine Services

**Anexo 5.** Antisuero aviar NewCastle (NDV) Charles River. Los antisueros estandarizados se producen para obtener altos niveles de actividad neutralizante, pero también se han utilizado para otras aplicaciones de laboratorio como inmunodifusión, inhibición de la hemaglutinación (HI) e inmunotransferencia. Se realizan más de 40 pruebas en cada antisuero y se proporciona una hoja de control de calidad que confirma la especificidad aquí presentada (*Avian Antigens & Antisera* | Charles River, 2021)



# CERTIFICATE OF ANALYSIS

**Marek's Disease Antiserum/Inactivated**  
(NOT FOR HUMAN CONSUMPTION)

**MATERIAL NUMBER:** 10100474 Lyophilized **BATCH NUMBER:** D0116  
10100627 Liquid

**DESCRIPTION OF PRODUCT:** Filter-sterilized serum prepared in specific pathogen free chickens.

**FORM AND AMOUNT:** 1 ml quantities

**PURITY:** Antiserum is mono-specific for the agent indicated and is serologically negative for all other common poultry pathogens.

**STABILIZERS/PRESERVATIVES ADDED:** None

**STORAGE CONDITIONS:** Store lyophilized/liquid product at -20 C. Reconstitute with 1 ml of sterile deionized or distilled water. After reconstituting, store at -20 C. May be freeze thawed repeatedly.

**INACTIVATION METHOD:** Heat inactivated at 56 C for 30 minutes.

**CAUTIONS OR HAZARDS:** Product is non-hazardous to humans. Non-infectious to poultry species.

**EXPIRATION DATE/SHELF LIFE:** 30-Sep-2021

**COUNTRY OF ORIGIN:** USA

*Judith Sanchez*  
**Judith Sanchez – Customer  
Service Representative**

**MAREK'S DISEASE ANTISERUM**  
(Chicken Origin)  
Heat Inactivated

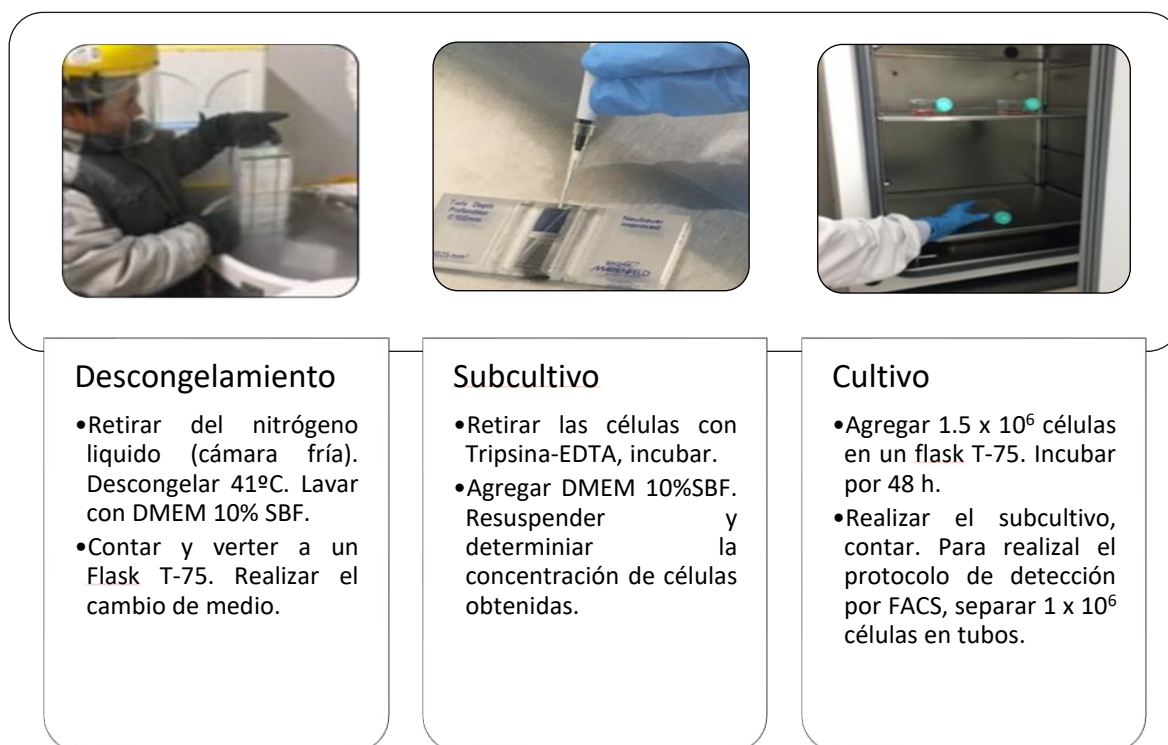
Lot No. D0116  
Expiration 09/21

|                                  |       |          |                                 |     |                   |
|----------------------------------|-------|----------|---------------------------------|-----|-------------------|
| Infectious Bronchitis Ark        | HI    | Negative | <b>Neutralizing Indices</b>     |     |                   |
| Infectious Bronchitis Mass       | HI    | Negative | Infectious Bursal Disease       | SN  | 10 <sup>1.0</sup> |
| Infectious Bronchitis Conn       | HI    | Negative | Infectious Laryngotracheitis    | SN  | 10 <sup>0.0</sup> |
| Infectious Bronchitis JMK        | HI    | Negative | Av. Encephalomyelitis           | SN  | 10 <sup>0.8</sup> |
| Infectious Bronchitis DE-072     | HI    | Negative | Infectious Bronchitis Ark       | SN  | 10 <sup>1.0</sup> |
| Newcastle Disease                | HI    | Negative | Infectious Bronchitis Conn      | SN  | 10 <sup>1.8</sup> |
| Paramyxovirus Type 2             | HI    | Negative | Infectious Bronchitis JMK       | SN  | 10 <sup>1.4</sup> |
| Paramyxovirus Type 3             | HI    | Negative | Infectious Bronchitis Mass      | SN  | 10 <sup>0.3</sup> |
| Avian Influenza Type A           | HI    | Negative | <b>Marek's Disease</b>          |     |                   |
| Avian Adenovirus Group III (EDS) | HI    | Negative | Inf. Bursal Disease             | AGP | Positive          |
| Avian Nephritis Virus            | MFIA  | Negative | Av. Adenovirus Grp II (HEV)     | AGP | Negative          |
| Inf. Bursal Disease              | MFIA  | Negative | Avian Adenovirus                | AGP | Negative          |
| Av. Adenovirus Grp II (HEV)      | MFIA  | Negative | Av. Encephalomyelitis           | AGP | Negative          |
| Avian Reovirus                   | MFIA  | Negative | Fowl Pox                        | AGP | Negative          |
| Newcastle Disease                | MFIA  | Negative | Av. Influenza A                 | AGP | Negative          |
| Av. Encephalomyelitis            | MFIA  | Negative | Inf. Laryngotracheitis          | AGP | Negative          |
| Infectious Bronchitis            | MFIA  | Negative | Newcastle Disease               | AGP | Negative          |
| Paramyxovirus Type 2             | MFIA  | Negative | Avian Reovirus                  | AGP | Negative          |
| Fowl Pox                         | MFIA  | Negative | Reticuloendotheliosis           | AGP | Negative          |
| Avian Lymphoid Leukosis (A,B,J)  | MFIA  | Negative | Av. Rotavirus                   | AGP | Negative          |
| Av. Influenza A                  | MFIA  | Negative | <b>Chick Anemia Virus</b>       |     |                   |
| Infectious Laryngotracheitis     | MFIA  | Negative | Avian Nephritis Virus           | IFA | Negative          |
| Mycoplasma gallisepticum         | SPA   | Negative | Avian Reovirus                  | IFA | Negative          |
| Mycoplasma synoviae              | SPA   | Negative | Av. Reticuloendotheliosis       | IFA | Negative          |
| Salmonella pullorum-gallinarum   | SPA   | Negative | <b>Avian Reovirus</b>           |     |                   |
| Avian Rhinotracheitis Virus      | ELISA | Negative | Av. Adenovirus Group I (I-XII)  | MNT | Negative          |
| Avian Lymphoid Leukosis (Virus)  | ELISA | Negative | Avian Lymphoid Leukosis (A,B,J) | MNT | Negative          |

*Theodore Girshick* 09/14/16  
Theodore Girshick, Ph.D. Date  
Director of Laboratory Operations  
Charles River Avian Vaccine Services

*Harriet Long* 14 Sep 21  
Quality Assurance Date  
Charles River Avian Vaccine Services

**ANEXO 6.** Flujograma de trabajo para el descongelamiento y cultivo de células DF-1. Las imágenes describen procesos desarrollados en los “Laboratorios de Investigación y Desarrollo FARVET”.



**ANEXO 7.** Preparación del medio DMEM. Para el cultivo de células DF-1.

El medio DMEM en polvo (HyClone-SH30004.04), se diluye en 1 L de agua ultrapura (MilliQ).

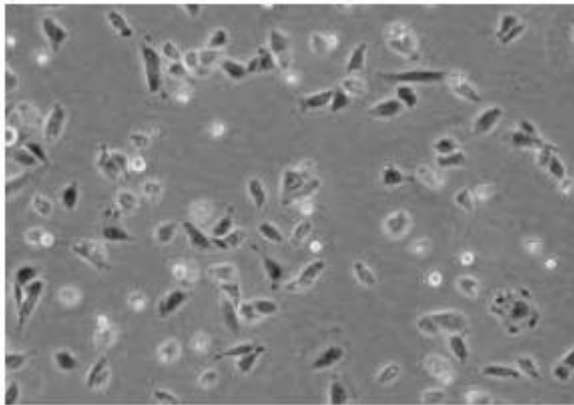
DMEM/F12.....15.6 g

Bicarbonato de Sodio (Sigma).....1.2 g

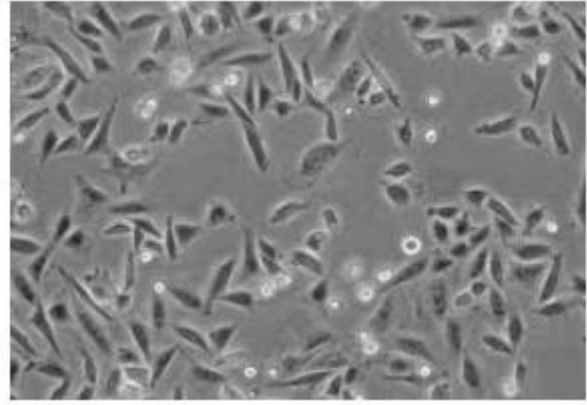
El pH se regula a 7.2 con la solución de Ácido Clorhídrico (HCl) 1N. En una cabina de flujo laminar pasar la totalidad del medio con un filtro de 0.22  $\mu$ m.

Para suplementar el medio, se agrega 1 ml de suero bovino fetal (SBF) por cada 10 mL de medio DMEM (DMEM + 10%SBF).

**ANEXO 8.** Imágenes guía para determinar el momento de subcultivo a una densidad saludable (70 -80% de confluencia). En las imágenes a la derecha se muestra a las células justo después de cultivar las células (después de subcultivar). A la izquierda se muestra justo antes de ser subcultivadas.



ATCC® CCL-61™ a baja densidad



ATCC® CCL-61™ a alta densidad

ATCC® ANIMAL CELL CULTURE GUIDE-tips and techniques for continuous cell lines [Ebook] (1st ed., pp. 6-7). Recuperado de:  
[https://www.atcc.org/~media/PDFs/Culture%20Guides/AnimCellCulture\\_Guide.ashx](https://www.atcc.org/~media/PDFs/Culture%20Guides/AnimCellCulture_Guide.ashx).

**ANEXO 9.** Tabla de datos utilizados para el cultivo de células DF-1, tanto infectadas (rHVT y HVT) como sanas. De acuerdo al formato de Plato de cultivo o Flask se tiene los datos de: área de superficie de cultivo, número de células al inicio del cultivo, número de células al final del cultivo, medio de cultivo (ml) necesario y cantidad necesaria de Tripsina EDTA (ml) para retirar las células al finalizar el cultivo.

| Formato de                 | Área de superficie (cm <sup>2</sup> ) | # Cel. inicio del cultivo (x10 <sup>6</sup> ) | # Cel. final del cultivo (x10 <sup>6</sup> ) | Medio de Cultivo (ml) | Tripsina EDTA (ml) |
|----------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------|--------------------|
| Platos de Cultivo 24 horas |                                       |                                               |                                              |                       |                    |
| 6 pozos                    | 9                                     | 1                                             | 1.8 – 2.3                                    | 2                     | 2                  |
| 12 pozos                   | 4                                     | 0.5                                           | 0.9 - 1                                      | 1                     | 1                  |
| 24 pozos                   | 2                                     | 0.25                                          | 0.45 - 0.56                                  | 0.5                   | 0.5                |
| 96 pozos                   | 0.1                                   | 0.05                                          | 0.09 - 0.12                                  | 0.1                   | 0.020              |
| Flask 48 horas             |                                       |                                               |                                              |                       |                    |
| T-25                       | 25                                    | 0.4                                           | 1.4 – 2                                      | 5                     | 1                  |
| T-75                       | 75                                    | 1                                             | 3.1 – 4                                      | 15                    | 3                  |
| T-225                      | 225                                   | 3                                             | 12.2 - 15                                    | 50                    | 10                 |

POE-LICM-017 Cultivo de células DF-1

**ANEXO 10.** Datos del cultivo de células DF-1 sanas, producto del cultivo de las células descongeladas, aptas para su uso. Estos datos son obtenidos del cultivo de cierto número de células iniciales (#CEL AL INICIO e6 (C0)), estos se llevaron a cabo en el Flask T-75 durante 48 horas de incubación a 40°C, 5% CO<sub>2</sub>. Mediante el subcultivo se obtiene un número de células finales (#CEL AL FINAL e6 (Cf)), con base a estos datos se obtienen el Tiempo de Duplicación (TD) y el coeficiente del porcentaje específico de crecimiento celular ( $\mu$ ).

| CULTIVO DE CÉLULAS DF-1 |                      |                       |                        |       |       |
|-------------------------|----------------------|-----------------------|------------------------|-------|-------|
| Flask                   | TIEMPO DE INCUBACIÓN | #CEL AL FINAL e6 (Cf) | #CEL AL INICIO e6 (C0) | TD    | $\mu$ |
| 75                      | 48                   | 3,12                  | 0,9                    | 26,76 | 0,026 |
| 75                      | 48                   | 3,18                  | 0,9                    | 26,36 | 0,026 |
| 75                      | 48                   | 6                     | 1,5                    | 24,00 | 0,029 |
| 75                      | 48                   | 8,12                  | 1,72                   | 21,44 | 0,032 |
| Promedio                |                      |                       |                        | 26,36 | 0,026 |

# ANEXO 11. Hoja de datos técnicos, kit Cytofix/Cytoperm BD Solución de Fijación y Permeabilización BD™. Aquí se expresa la descripción del producto y un protocolo de su uso recomendado (BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit, 2021).

BD Cytofix/Cytoperm™

## Technical Data Sheet

### Fixation and Permeabilization Solution

#### Product Information

Material Number: 554722  
Size: 125 mL

#### Description

BD Cytofix/Cytoperm™ solution is supplied as a 1X solution and can be used for the simultaneous fixation and permeabilization of cells prior to intracellular cytokine staining.

#### Preparation and Storage

Store undiluted at 4°C.

#### Application Notes

##### Application

|                                         |                  |
|-----------------------------------------|------------------|
| Intracellular staining (flow cytometry) | Routinely Tested |
|-----------------------------------------|------------------|

##### Recommended Assay Procedure:

For the stimulation of cells, various *in vitro* methods have been reported for stimulating cells to produce cytokines. Polyclonal activators have been particularly useful for inducing cytokine-producing cells. These activators include the following: concanavalin A, lipopolysaccharide, phorbol esters plus calcium ionophore or ionomycin, phytohemagglutinin, staphylococcus enterotoxin B, and monoclonal antibodies directed against subunits of the TCR/CD3 complex (with or without antibodies directed against costimulatory receptors, such as CD28).

##### 1. Fix and Permeabilize Cells

- Thoroughly resuspend cells in 100 µL of BD Cytofix/Cytoperm solution per well for microwell plates (or 250 µL for tubes) and incubate for 20 min. at 4°C. **Note:** Cell aggregation can be avoided by vortexing prior to the addition of the BD Cytofix/Cytoperm™ solution.
- Wash cells two times in a buffer that contains a cell permeabilizing agent such as saponin (BD Perm/Wash™ buffer, Cat. 554723, which can be used as the wash buffer and as the antibody diluent).

##### 2. Stain for Intracellular Cytokines

- Thoroughly resuspend fixed/permeabilized cells in 50 µL of a saponin-containing buffer (e.g., BD Perm/Wash™ buffer) containing a pre-determined optimal concentration of a fluorochrome-conjugated anti-cytokine antibody or appropriate negative control. Incubate at 4°C for 30 minutes in the dark. **Note:** Because saponin-mediated cell permeabilization is a reversible process, it is important to keep the cells in the presence of saponin during intracellular cytokine staining.
- Wash cells 2 times with saponin-containing buffer (e.g., BD Perm/Wash™ buffer) and resuspend in staining buffer prior to flow cytometric analysis.

**Note:** Both the BD Cytofix/Cytoperm™ (Cat. No. 554722) and BD Perm/Wash buffer (Cat. No. 554723) are included in the Fixation/Permeabilization Solution Kit (Cat. No. 554714) as well as the Fixation/Permeabilization Solution Kit with BD GolgiStop (containing monensin), Cat. No. 554715 and Fixation/Permeabilization Solution Kit with GolgiPlug (containing brefeldin A), Cat. No. 555028).

#### Danger

BD Cytofix/Cytoperm™ Buffer (Fixation and Permeabilization Solution) contains 4.2% formaldehyde (w/w).

#### Hazard statements

Harmful if inhaled.  
Causes skin irritation.  
Causes serious eye damage.  
May cause an allergic skin reaction.  
Suspected of causing genetic defects.  
May cause cancer. Route of exposure: Inhalative.  
May cause respiratory irritation.

#### Precautionary statements

Wear protective clothing / eye protection.  
Wear protective gloves.  
Do not breathe mist/vapours/spray.  
IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do.  
Continue rinsing.  
If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.

#### Suggested Companion Products

| Catalog Number | Name                                               | Size      | Clone  |
|----------------|----------------------------------------------------|-----------|--------|
| 554723         | Perm/Wash Buffer                                   | 100 mL    | (none) |
| 554714         | BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit | 250 Tests | (none) |
| 554715         | BD Cytofix/Cytoperm Plus Kit (with BD GolgiStop)   | 250 Tests | (none) |
| 555028         | BD Cytofix/Cytoperm Plus Kit (with BD GolgiPlug)   | 250 Tests | (none) |

#### Product Notices

- Please refer to [www.bdbiosciences.com/pharmingen/protocols](http://www.bdbiosciences.com/pharmingen/protocols) for technical protocols.

#### References

Assenmacher M, Schmitz J, Radbruch A. Flow cytometric determination of cytokines in activated murine T helper lymphocytes: expression of interleukin-10 in interferon-gamma and in interleukin-4-expressing cells. *Eur J Immunol.* 1994; 24(5):1097-1101. (Methodology)  
Elson LH, Nutman TB, Metcalfe DD, Prussin C. Flow cytometric analysis for cytokine production identifies T helper 1, T helper 2, and T helper 0 cells within the human CD4+CD27- lymphocyte subpopulation. *J Immunol.* 1995; 154(9):4294-4301. (Methodology)  
Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1993; 159(1-2):197-207. (Methodology)  
Prussin C, Metcalfe DD. Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. *J Immunol Methods.* 1995; 188(1):117-128. (Methodology)  
Sander B, Andersson J, Andersson U. Assessment of cytokines by immunofluorescence and the paraformaldehyde-saponin procedure. *Immunol Rev.* 1991; 119:65-93. (Methodology)

**ANEXO 12.** Preparación de reactivos para la determinación del protocolo de detección y la elección del mejor permeabilizador celular.

Kit Cytotfix/Cytoperm BD (Cat. No. 554714)

- DPBS-Buffer fosfato salino de Dulbecco 1X (Sigma D5652): Se diluye en un 1 L de agua ultrapura (MilliQ), 9.6 g de DPBS (Sigma). Pasar la totalidad por un filtro de 0.22  $\mu$ m. Almacenar solución de trabajo a 4 °C.
- BD Perm/Wash™ buffer 1X: La solución BD Perm/Wash™ Buffer 10X (Cat. No. 554714), se diluye 1:10 con agua ultrapura (MilliQ), para obtener esta solución de trabajo a 1 X.
- BD Perm/Wash buffer 1X +5% de Suero Normal de Ratón (NMS): Por cada 1 ml de BD Perm/Wash buffer 1X, se agregó, en esterilidad, 50  $\mu$ l de suero normal de ratón.
- BD Perm/Wash buffer 1X +5% de Albumina de Suero Bovino (BSA): Se diluyo 5 g de BSA en 100 ml de BD Perm/Wash buffer 1X. Almacenar a 4 °C hasta el momento de uso.

Protocolo con Saponina 0.5%- *In House*

- DPBS-Buffer fosfato salino de Dulbecco 1X (Sigma D5652): Se diluye en un 1 L de agua ultrapura (MilliQ), 9.6 g de DPBS (Sigma). Pasar la totalidad por un filtro de 0.22  $\mu$ m. Almacenar solución de trabajo a 4 °C.
- Formaldehído al 4%: Se diluye 540  $\mu$ l de Formaldehído en solución aprox. 37% (Merk) en un 5 mL de DPBS. Se almacena a 4 °C, hasta el momento de uso.

- DPBS + 5% de suero bovino fetal (SBF): Por cada 10 ml DPBS se agrega 0.5 ml de suero bovino fetal en esterilidad. Almacenar a 4 °C, verificar su contaminación, antes del uso.
- Saponina 0.5%: Se diluye 0.25 g de saponina en 5 ml de DPBS. Estos 5 ml, agregando 45 ml de DPBS. Se almacena a 4 °C.
- Saponina 0.5% + 5% de Albumina de Suero Bovino (BSA): Se diluyo 5 g de BSA en 100 ml de Saponina 0.5%. Almacenar a 4 °C hasta el momento de uso.

#### Protocolo Tritón X-100 0.5% - *In House*

- DPBS-Buffer fosfato salino de Dulbecco 1X (Sigma D5652): Se diluye en un 1 L de agua ultrapura (MilliQ), 9.6 g de DPBS (Sigma). Pasar la totalidad por un filtro de 0.22 µm. Almacenar a 4 °C.
- Formaldehído al 4%: Se diluye 540 µl de Formaldehído en solución aprox. 37% (Merk) en un 5 mL de DPBS. Se almacena a 4 °C, hasta el momento de uso.
- DPBS + 5% de Suero bovino Fetal (SBF): Por cada 10 ml DPBS se agrega 0.5 ml de suero bovino fetal en esterilidad. Almacenar a 4 °C, verificar su contaminación, antes del uso.
- Tritón X-100 al 0.5%: Se diluyo 5 µl de Tritón X-100 en 1 ml de DPBS. Mezclar por inversión.
- DPBS + 5% suero normal de ratón (NMS): Se agregó 50 µl de NMS a 1 ml de saponina 0.5%. Mezclar al vortex.

**ANEXO 13.** Preparación de reactivos para el “protocolo de detección de células DF-1 infectadas con HVT por citometría de flujo (protocolo *in house*)”

- DPBS-Buffer fosfato salino de Dulbecco 1X (Sigma D5652): Se diluye en un 1 L de agua ultrapura (MilliQ), 9.6 g de DPBS (Sigma). Pasar la totalidad por un filtro de 0.22  $\mu$ m. Almacenar solución de trabajo a 4 °C.
- Formaldehído al 4%: Se diluye 540  $\mu$ l de Formaldehído en solución aprox. 37% (Merk) en un 5 mL de DPBS. Se almacena a 4 °C, hasta el momento de uso.
- Saponina 0.5%: Se diluye 0.25 g de saponina en 5 ml de DPBS. Estos 5 ml, agregando 45 ml de DPBS. Se almacena a 4 °C.
- Solución de bloqueo y permeabilización (Saponina 0.5%+ 5% suero normal de ratón): Se agregó 50  $\mu$ l de NMS a 1 ml de saponina 0.5%. Mezclar al vortex.

**Anexo 14:** Información de producto. Saponina purificada de Quillaja Bark (Prod.No. S4521-Sigma) (Saponin Quillaja sp. Sapogenin content 20-35 % | Sigma-Aldrich, 2021).



3050 Spruce Street  
Saint Louis, Missouri 63103 USA  
Telephone 800-325-5832 • (314) 771-5765  
Fax (314) 286-7828  
email: techserv@sia.com  
sigma-aldrich.com

## ProductInformation

### SAPONIN FROM QUILLAJA BARK PURIFIED

Sigma Prod. No. S4521

Storage: Room Temperature

CAS NUMBER: 8047-15-2

SYNONYMS: Sapogenin Glycosides<sup>1</sup>

#### STRUCTURE:

Quillaja saponaria saponin (Quillaja saponins) is a heterogenous mixture of molecules varying both in their aglycone and sugar moieties.<sup>2</sup> The main aglycone (sapogenin) moiety is quillaic acid, a triterpene of predominantly 30-carbon atoms (hydrophobic) of the  $\Delta^{12}$ -oleanane type. The aglycone is bound to various sugars (hydrophilic) including glucose, glucuronic acid, galactose, xylose, apiose, rhamnose, fucose and arabinose. Sapogenin devoid of any sugars can be isolated by acid hydrolysis of saponins.<sup>3,4,5,6,7</sup> The structure of a component isolated from the acylated triterpenoid saponin mixture of Quillaja saponaria was reported.<sup>8</sup>

#### PHYSICAL DESCRIPTION:

Appearance: powder<sup>3</sup>

Methods for the identification and quantitative determination of the aglycone and carbohydrate moieties of saponins have been reported.<sup>2,4,9,10,11</sup>

#### METHOD OF PREPARATION:

Quillaja saponin is obtained from the bark of the South American soap tree, Quillaja saponaria Molina (Rosaceae family). Product S4521 is purified by ultrafiltration to reduce low molecular weight contaminants.<sup>3</sup> A general method of preparation of the extract has been reported.<sup>2</sup>

#### STABILITY / STORAGE AS SUPPLIED:

Quillaja saponin is hygroscopic and is expected to be stable for at least one year at room temperature when stored dry.

#### SOLUBILITY / SOLUTION STABILITY:

Quillaja saponin is soluble in water yielding micelles with an average MW of 56,000. The solubility is tested at 50 mg/ml deionized water.<sup>3</sup> The solubility in water may be increased by additions of small amounts of alkali.<sup>12</sup>

### SAPONIN FROM QUILLAJA BARK PURIFIED

Sigma Prod. No. S4521

#### SOLUBILITY / SOLUTION STABILITY: (continued)

Quillaja saponin is soluble in hot alcohol and is insoluble in most organic solvents. Aqueous solutions will froth when shaken; the froth can be dispersed by alcohol or ether.<sup>12</sup> Quillaja saponin solutions are not autoclavable. Solutions have been found to be stable for about one month when stored at 2-8°C.<sup>3</sup>

#### USAGE / APPLICATIONS:

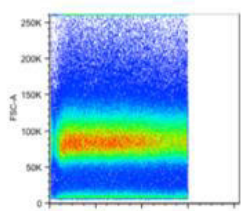
Saponin (plant source not identified) solutions have been used in the following ways: concentrations of 0.005%-0.01% were used to permeabilize cultured human intestinal epithelial cells after incubation for 30 minutes prior to immunofluorescence;<sup>13</sup> a 0.05% solution of saponin was used to permeabilize paraformaldehyde-saponin-fixed human fibroblasts for staining of the intracellular fibronectin by peroxidase conjugates for light and electron microscopy;<sup>14</sup> saponins (surface-active agents) have also been used to lyse the outer membranes of Rous sarcoma viruses, cell membranes of chicken liver and erythrocytes of human and guinea pig. Washed erythrocytes were suspended in isotonic saline and lysed by pouring into aqueous or saline solutions of saponin. Hemolysis was complete at 37°C for 30 minutes. At a saponin concentration of 0.05%, a large number of pits in the erythrocyte cell membrane was observed by electron microscopy whereby a 0.09% saponin concentration effected complete dissolution of the erythrocyte ghosts.<sup>15</sup>

Partially purified Quillaja saponins were reported to associate with hydrophobic or amphipathic proteins and lipids to form detergent/lipid/saponin complexes termed ISCOM (immunostimulating complexes). The ISCOMs, depending on the preparation, may induce serum antibody titers which are about 10-fold higher than titers produced by immunization with protein micelles alone.<sup>16</sup> The isolation and quantification of purified Quillaja saponins and lipids in ISCOMs have been described.<sup>17</sup> Orally fed Quillaja saponin was reported to enhance the immunopotentiating ability of an intraperitoneally administered inactivated rabies vaccine in mice.<sup>18</sup> Purified saponin from crude Quillaja saponaria amplified antigen-specific immune responses to an experimental HIV-1 vaccine<sup>19</sup> and potentiated an immune response elicited by albumin and venom both in mice.<sup>20</sup> Quillaja saponin has been shown to influence cholesterol metabolism and blood lipid profiles in animals. For casein-fed animals but not soy-fed, saponin significantly lowered the LDL cholesterol and LDL/HDL ratios but had no influence on the serum lipids of isolated soy protein (ISP)-fed animals. These results suggest that Quillaja saponins may interact differently with different proteins.<sup>21</sup>

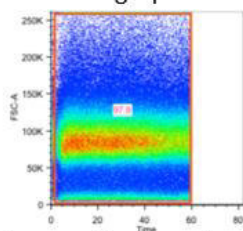
**ANEXO 15.** Estrategia de análisis y agrupamiento para los datos de citometría de flujo tanto para HTV como para las células con GFP.

### Estabilidad de Flujo

Esperar la estabilización del flujo, eliminando los problemas de instrumento.



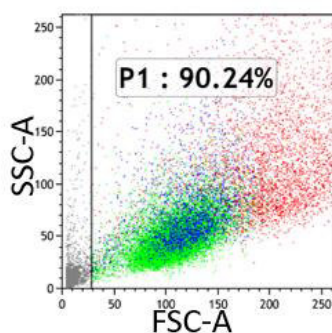
No agrupado



Agrupación removiendo el mal flujo

### Dispersión frontal y lateral

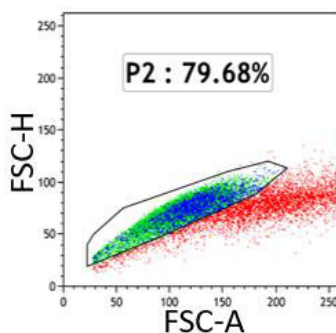
Elimina escombros y se conservan las células según su tamaño (FSC) o la complejidad (SSC).



Se excluyen escombros

### Geometría del pulso

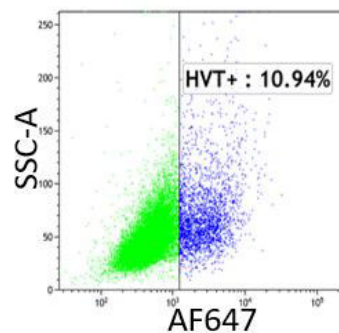
Eliminar los dobletes del conjunto de datos. A través de FSC-H vs FSC-A.



Se agrupa células en línea

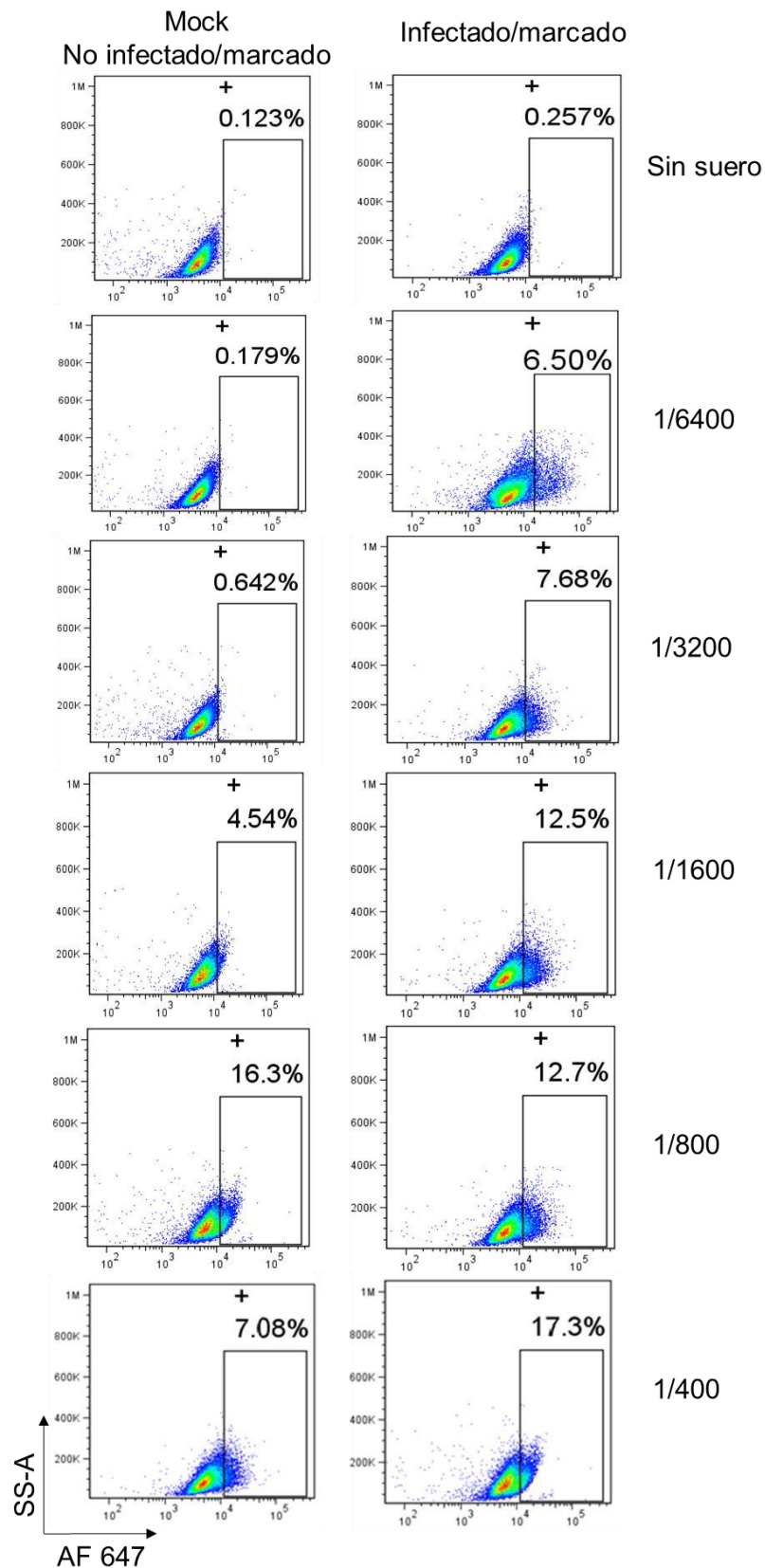
### Backgating

Proporciona la visión de las células desde la ventana inicial hasta la final.

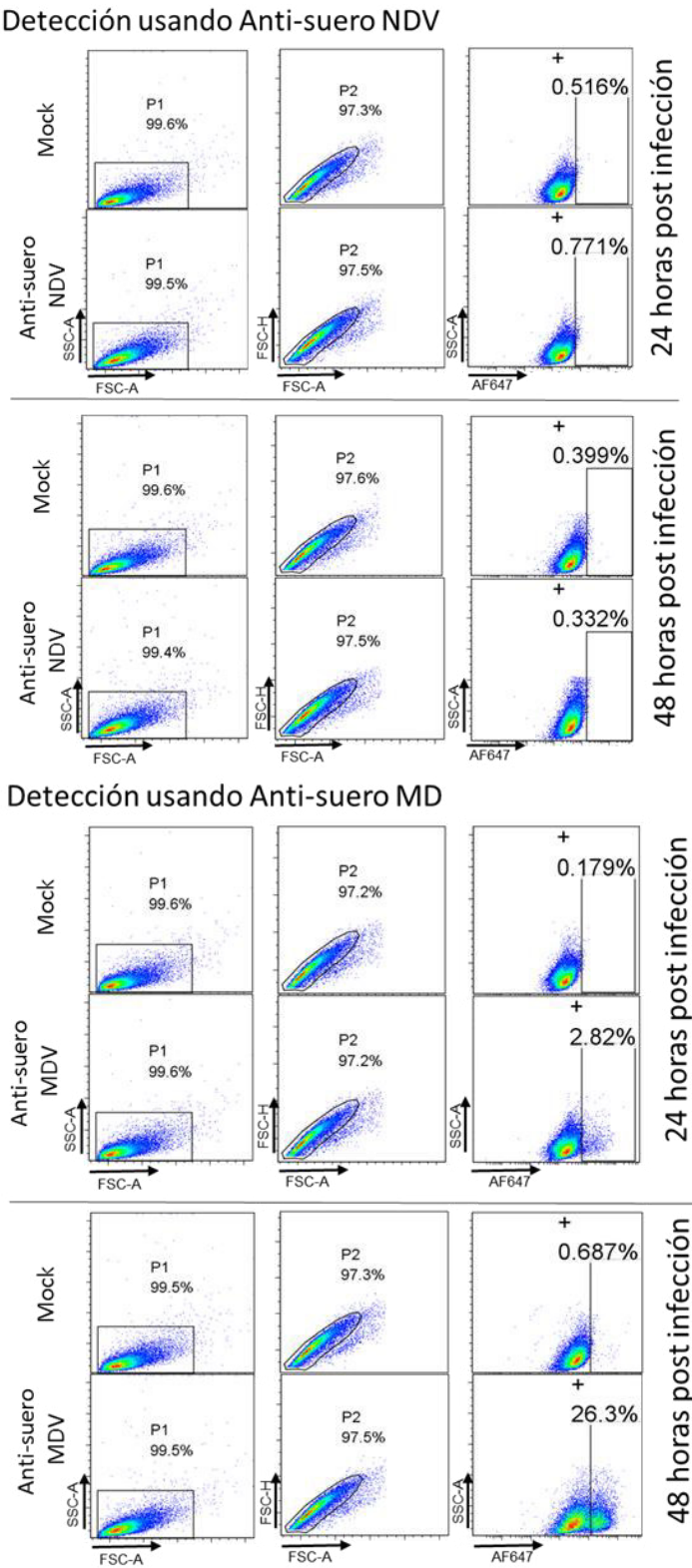


Células HVT+ se visualizan en azul, en todo el proceso de análisis.

**ANEXO 16.** Titulación del antisuero para la enfermedad de Marek (MDV), usando el “protocolo de detección de células DF-1 infectadas con HVT por citometría de flujo (protocolo *in house*, figura 8)”. El anticuerpo secundario Alexa Flúor® 647 fue utilizado a una dilución de 1/1600.

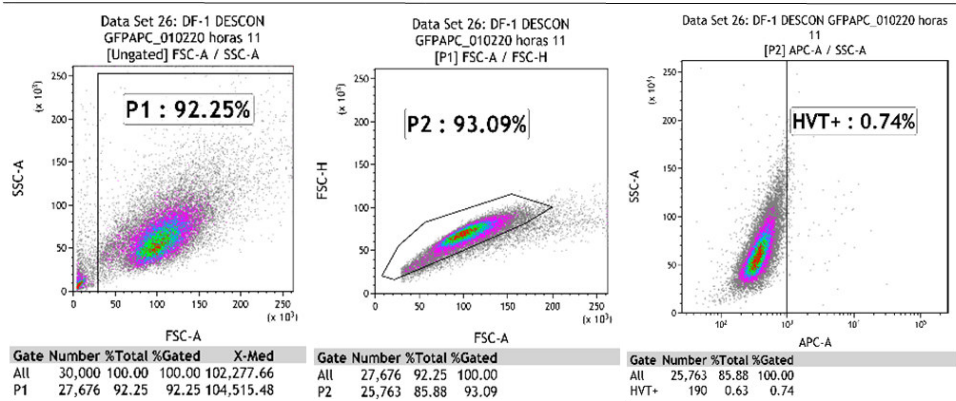


**ANEXO 17:** Determinación de la especificidad del antisuero MDV y NDV para la detección de células infectadas por HVT mediante el “protocolo de detección de células DF-1 infectadas con HVT por citometría de flujo (protocolo *in house*)” (Figura 8).

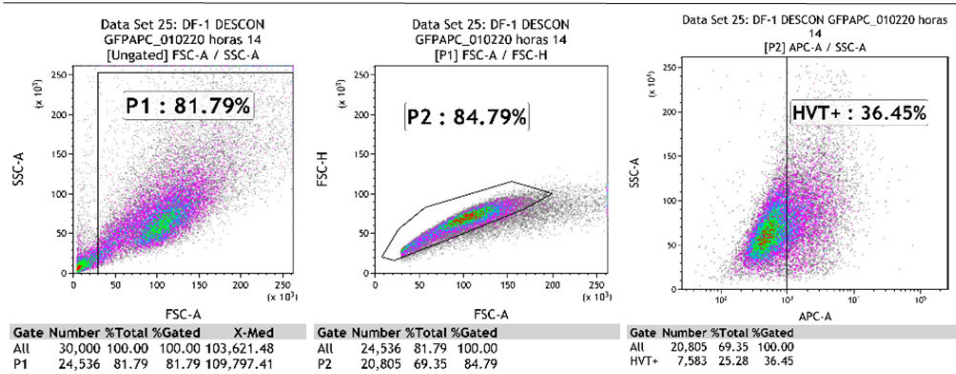


**ANEXO 18:** Análisis de los datos adquiridos al citómetro controles sanos y células infectadas con HVT y células infectadas no marcadas. La marcación por el protocolo *in house* (saponina 0.5%), Se parecía también la fluorescencia que se halla en las células infectadas sin marcar. Gráfico obtenido del software de análisis Kaluza (APC=AF647).

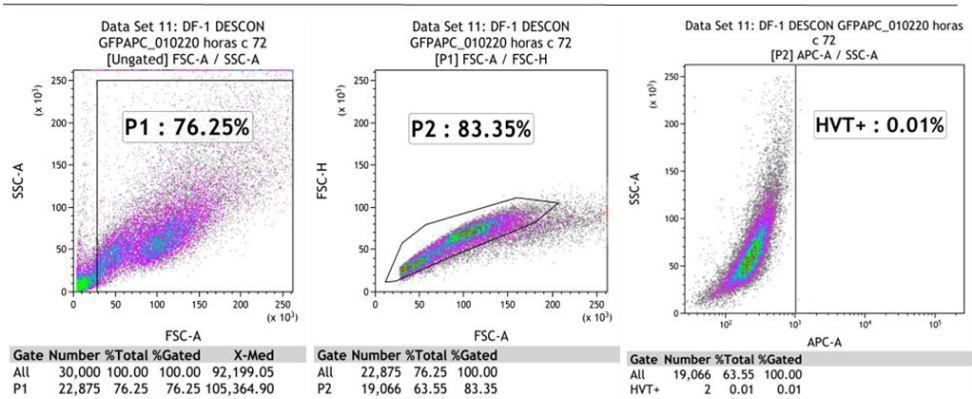
Células DF-1 Sanas (Mock)



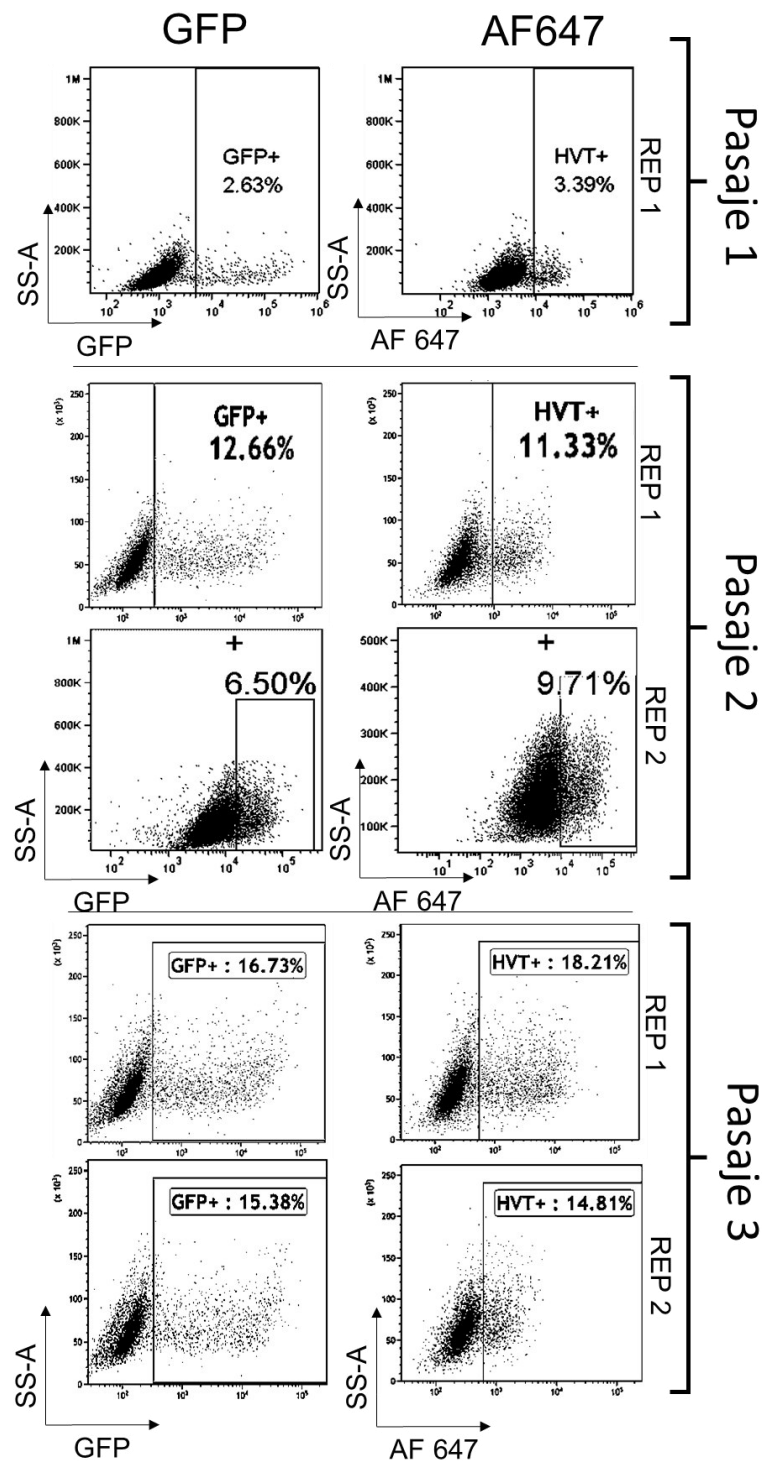
Células DF-1 infectadas



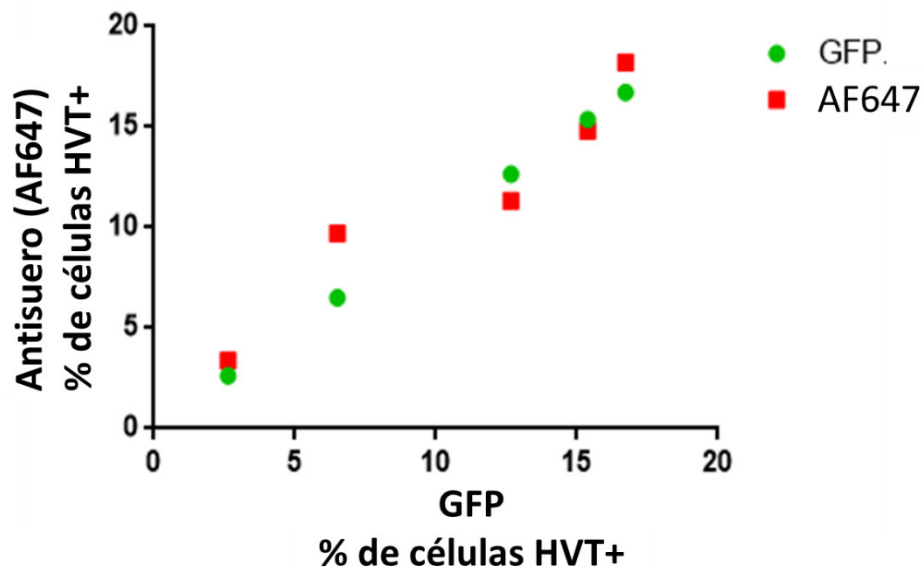
Células DF-1 infectadas no marcadas



**ANEXO 19:** De los 3 pasajes realizados en el cultivo de células DF-1 infectadas con rHVT-GFP se tomó una muestra del primer pasaje (REP1), dos muestras del pasaje 2 y 3 (REP 1 y REP 2) estas fueron observadas por microscopia de fluorescencia (Figura 9), antes de ser retiradas y marcadas. En este gráfico se observa la detección por citometría de flujo del porcentaje de células positivas a GFP y detectadas por el antisuero + anticuerpo secundario 647 ambos valores resultantes comprenden valores similares.



**ANEXO 20:** Gráfico de puntos entre el porcentaje de las células con expresión de GFP y el porcentaje de células detectadas con HVT por el antisuero MDV mediante citometría de flujo.



**ANEXO 21:** Tabla con los valores obtenidos después del análisis de correlación de Pearson (GraphPad Prism v.6) entre los porcentajes de células positivas a GFP vs las detectadas por el antisuero MDV y el anticuerpo secundario AF647.

|                                    | <b>GFP.<br/>vs.<br/>AF647.</b> |
|------------------------------------|--------------------------------|
| <b>Pearson r</b>                   |                                |
| <b>r</b>                           | 0,9557                         |
| <b>95% intervalo de confianza</b>  | 0,4682 to 0,9972               |
| <b>R cuadrado</b>                  | 0,9134                         |
| <b>P valor</b>                     |                                |
| <b>P (dos-colas)</b>               | 0,0111                         |
| <b>Resumen del valor P</b>         | *                              |
| <b>Significante? (alfa = 0.05)</b> | Yes                            |
| <b>Numero de pares XY</b>          | 5                              |