



DESCRIPCIÓN DE UN MÉTODO CUANTITATIVO DE PCR PARA LA ESTIMACIÓN DEL CONTENIDO DE VIRUS EN VACUNAS MULTIVALENTES DE ROTAVIRUS

María L. Pombo

Departamento de Control de Vacunas
Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"
Junio 23, 2006
Caracas - Venezuela

CONTENIDO DE LA PRESENTACIÓN

- Ensayos empleados para determinar la concentración de virus en vacunas atenuadas de rotavirus

- Descripción del ensayo cuantitativo de PCR
 - Diagrama de flujo del ensayo
 - Primers y sondas
 - Infección del virus
 - TR-CPCR
 - Análisis de los datos
 - Criterios de validez del ensayo
 - Interpretación de los resultados

- Resumen de la presentación

ENSAYOS EMPLEADOS PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN DE VIRUS EN VACUNAS ATENUADAS DE ROTAVIRUS

“La concentración de virus puede ser determinada mediante la titulación de la infección, ejm., ensayos de formación de placa o de formación de focos. Sin embargo, es un desafío confirmar la cantidad de cada serotipo en la mezcla final de una vacuna multivalente. Los métodos convencionales de titulación requieren de anticuerpos específicos para determinar cada componente de la vacuna. Existen métodos moleculares de medición de concentración de virus que han sido desarrollados y evaluados, tales como el ensayo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de tiempo real, los cuales no requieren del empleo de anticuerpos específicos” (WHO, 2005).

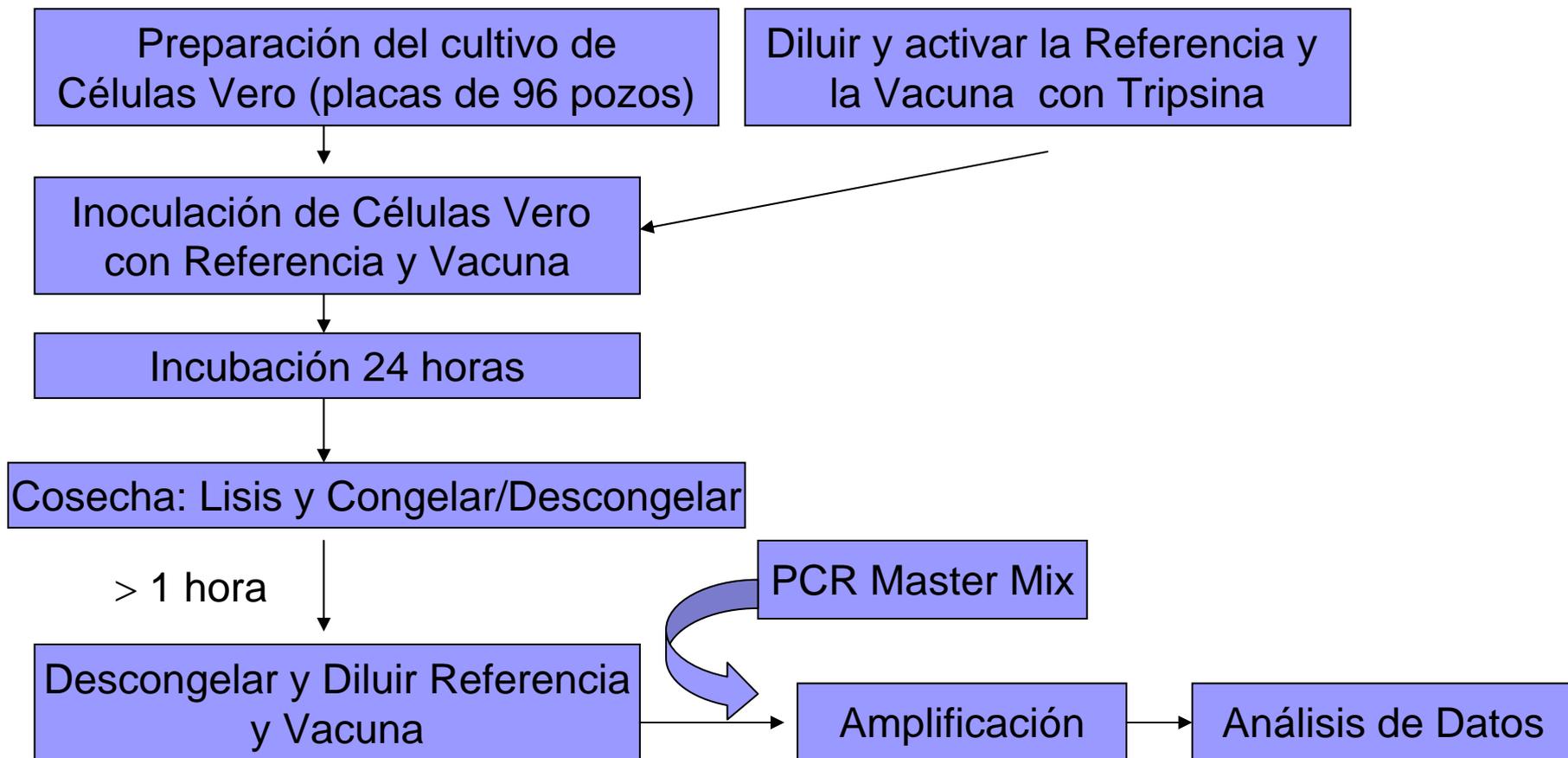
DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO CUANTITATIVO DE PCR (C-PCR)

- Se emplean monocapas de células Vero sembradas en placas de microtitulación de 96 pozos las cuales son inoculadas con diluciones de una vacuna de referencia multivalente y las muestras.
- Transcurridas 24 horas desde la inoculación, la replicación viral se produce, inmediatamente se procede a la lisis de las células mediante la adición de Triton y un ciclo de congelamiento y descongelamiento.
- Las células lisadas son sometidas al ensayo cuantitativo de la reacción en cadena de la polimerasa (C-PCR) y el contenido de ácido nucleico del rotavirus es cuantificado (Ranheim T., et al. J. of Virological Methods, In press)

DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO CUANTITATIVO DE PCR (C-PCR)

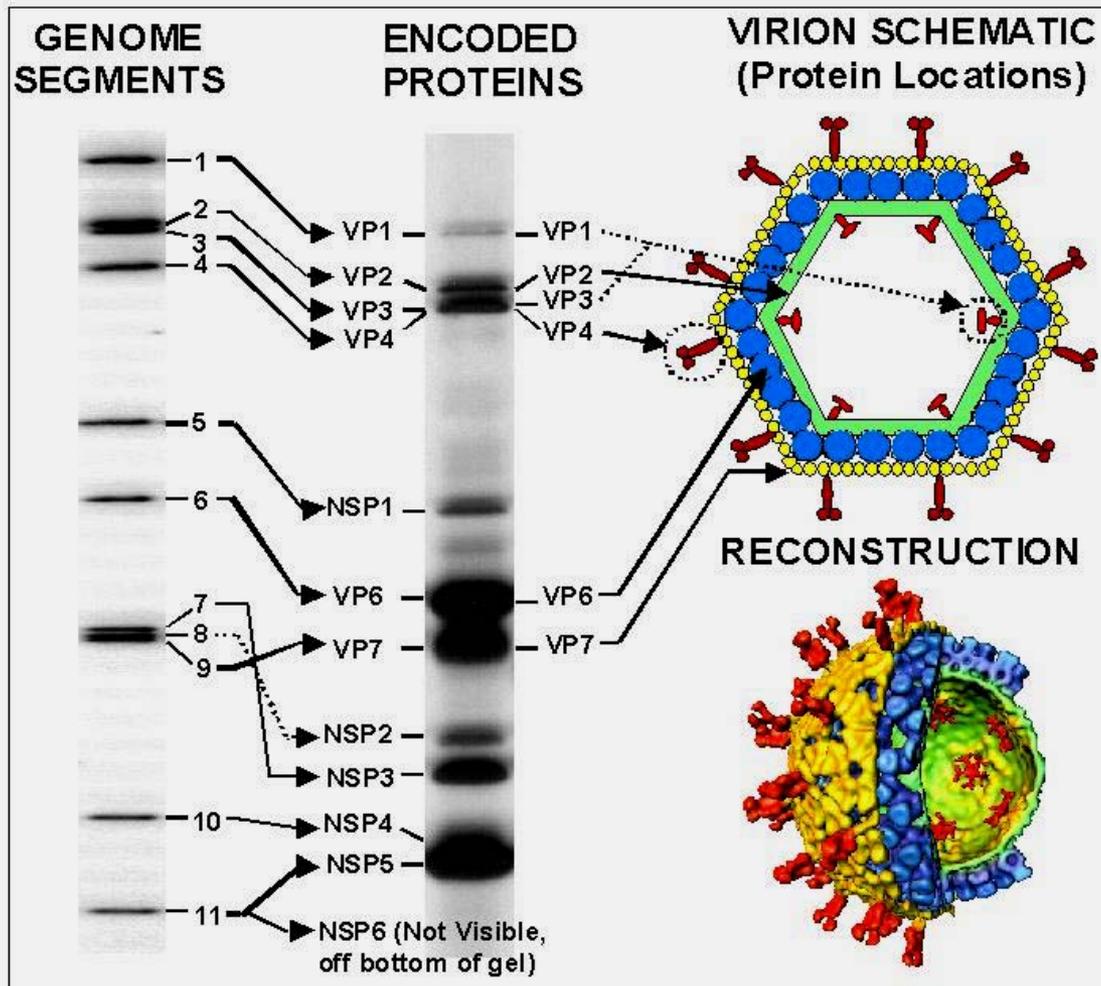
- Reacciones individuales cuantitativas de PCR son realizadas empleando grupos de primers/sondas específicos para cada cepa re-ordenada del virus.
- La concentración del virus es determinada mediante el ensayo de líneas paralelas entre la vacuna de referencia y la muestra.
- Los resultados son registrados como Unidades de infección (UI/mL) la cual es “la infectividad viral relativa de una muestra inoculada en monocapas de células Vero medida mediante el ensayo C-PCR contra una preparación de referencia” (WHO, 2005)

DIAGRAMA DE FLUJO DEL ENSAYO



PRIMERS/SONDAS

- **No existen Estándares Internacionales hasta el momento** y la OMS está considerando el desarrollo de dichos reactivos, su caracterización y su estandarización mediante un Estudio Colaborativo Internacional.
- Los Primers y Sondas son específicos para el gen VP7 (segmento 9 del genoma) de cada cepa re-ordenada resultando altamente específica la detección de cada virus en presencia de otros rotavirus en la vacuna. Tanto la secuencia de los primers como de las sondas se encuentra en (Ranheim T., et al. J. of Virological Methods, In press)
- El ensayo C-PCR también puede ser empleado como ensayo de identidad.



COMO SE OBSERVARÍAN LOS RESULTADOS DE UN ENSAYO DE IDENTIDAD PARA ROTAVIRUS

INFECCIÓN DEL VIRUS

- Diluir las vacunas de referencia y bajo ensayo en EMEM con HEPES, suplementado con GlutaMAX, Pen/Strep, Trypsina y sucrosa.
- Preparar 4 diluciones seriadas de la vacuna de referencia y 2 de la vacuna bajo ensayo, inocular dichas diluciones en una monocapa de células Vero, e incubar a 37°C durante 24 horas.
- Agregar una solución de Triton a cada pozo de la placa de microtitulación, y cubrir la placa y almacenarla a -60 to -80°C antes de iniciar el ensayo cuantitativo de tiempo real.

ENSAYO CUANTITATIVO DE TIEMPO REAL DE PCR

- Remover las placas de -60 to -80°C y descongeladas durante 20 – 40 minutos a temperatura ambiente.
- Mezclar el contenido de las placas en un vortex durante 10 segundos, y centrifugar a 1000 rpm durante 1 minuto con la finalidad de llevar todo el contenido de la placa al fondo de los pozos.
- Preparar la dilución de las células lisadas.
- Detectar cada una de las cepas re-ordenadas del virus por separado, empleando el ensayo cuantitativo de PCR, en tiempo real.

ENSAYO CUANTITATIVO DE TIEMPO REAL DE PCR

- Preparar la solución “master mix” incompleta para el PCR y almacenarla de 2 – 8°C por un máximo de 1 semana antes de usar.
- Completar la solución “master mix” mediante la adición del inhibidor de la RNase, los primers 5´y 3´, la sonda, AmpliTaqGold y la Transcriptasa Reversa.
- Mezclar en cada pozo de la placa de reacción del ensayo C-PCR la solución completa de “master mix” y las diluciones de las células lisadas.
- Centrifugar la placa de reacción del ensayo C-PCR a 1000 rpm durante 1 minuto, a temperatura ambiente, y colocar la placa en el equipo de PCR cuantitativo de tiempo real.

ANÁLISIS DE LOS DATOS

- La información proveniente del equipo de PCR cuantitativo de tiempo real pueden ser reportados como valores Ct
- Analizar los datos en hojas de reporte y calcular la concentración del virus individualmente por réplicas, empleando:
 - Análisis de líneas paralelas con 4-puntos en la curva estándar
 - Dos puntos en la línea de la muestra bajo ensayo
- Determinar la concentración de cada cepa re-ordenada de rotavirus en el lote de vacuna bajo ensayo.

CRITERIOS DE VALIDEZ DEL ENSAYO

- Los controles (Vacuna de referencia) deben estar conformes
- Los resultados deben ser de réplicas de ensayos independientes, y **los mismos deben estar establecidos por cada laboratorio**
- Los criterios para la eliminación de puntos en las curvas **deben ser establecidos por cada laboratorio**

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

- A diferencia de los ensayos de titulación en placas, el ensayo cuantitativo de PCR es un ensayo de potencia relativa, en donde la vacuna bajo ensayo es evaluada contra una vacuna de referencia y los resultados son reportados en valores absolutos.
- Los resultados son expresados como UI/mL

RESUMEN DE LA PRESENTACIÓN

- Este ensayo C-PCR es un ensayo de potencia relativa
- No requiere del empleo de anticuerpos específicos, y permite confirmar la cantidad de cada serotipo de virus presente en la mezcla final de la vacuna multivalente
- No existen hasta el momento Estándares Internacionales (Primers, Sondas, Vacuna de referencia multivalente)
- Los resultados son obtenidos a las 24 horas después de la infección de la monocapa de células Vero
- El costo de esta tecnología y el entrenamiento del personal deben ser evaluados antes de su implementación
- Los criterios de validez deben ser establecidos por cada laboratorio